

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/FI05/000011

International filing date: 11 January 2005 (11.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FI  
Number: 20040116  
Filing date: 28 January 2004 (28.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 March 2005 (07.03.2005)

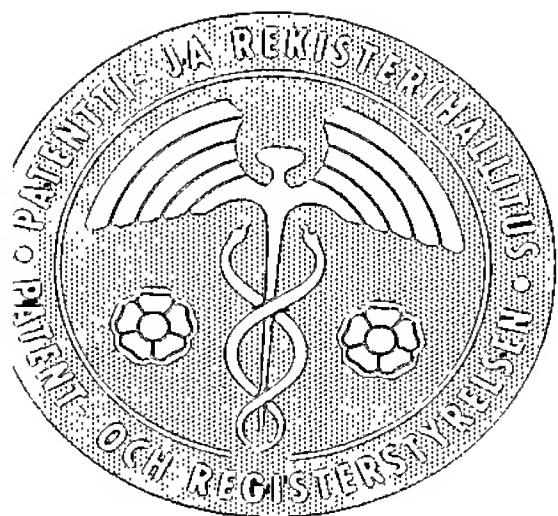
Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Helsinki 24.2.2005

E T U O I K E U S T O D I S T U S  
P R I O R I T Y D O C U M E N T



Hakija  
Applicant

Macrocrystal Oy  
Espoo

Patentihakemus nro  
Patent application no

20040116

Tekemispäivä  
Filing date

28.01.2004

Kansainvälinen luokka  
International class

C07K

Keksinnön nimitys  
Title of invention

"Menetelmä proteiinien kiteyttämiseksi hiilihydraattirunkoisilla  
polymeereillä"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä  
Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä,  
patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the  
description, claims, abstract and drawings, originally filed with the  
Finnish Patent Office.

Markketa Tehikoski  
Apulaistarkastaja

Maksu 50 €  
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kaappa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1142/2004  
Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No.  
1142/2004 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and  
Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500 Telefax: 09 6939 5328  
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500 Telefax: + 358 9 6939 5328  
FI-00101 Helsinki, FINLAND

L 2

# MENETELMÄ PROTEIINIEN KITEYTTÄMISEKSI HIILIHYDRAATTIRUNKOISILLA POLYMEEREILLÄ

L 5

## Tiivistelmä

5

Keksinnön kohteena on makromolekyylien, erityisesti proteiinien ja polypeptidien kiteytysmenetelmä jossa käytetään reagensseina valittuja hiilihydraattirunkoisia biologista alkuperää olevia polymeerejä kuten alginaattia, pektiiniä, dekstriiniä tai kitosaania ja näiden hydrolysaatteja. Menetelmällä voidaan estää kiteiden sedimentoituminen ja täten edistää tuotteen pysyvyyttä tasa-aineisena. Menetelmällä voidaan valmistaa polypeptideistä uusia kidemuotoja ja edistää kiteiden pysyvyyttä.

L 9

## Polymeerejä koskevaa tunnettua tekniikkaa

15 Kitosaania, alginaattia ja pektiiniä käytetään laajasti erilaisissa bioteknologian sovellutuksissa. Näiden polymeerien käytöstä löytyykin runsaasti muun muassa katsaus-tyyppistä kirjallisuutta. Osa julkaisuista käsittelee kyseisten polymeerien yleistä käyttöä (Hirano 1996) kun taas toiset keskittyvät tiettyyn käyttösovellusalueeseen kuten lääkkeiden tuotekehitykseen (Borchard ja Junginger 2001; Singla ja Chawla 2001; Tonnesen ja Karlsen 2002).

Näiden polymeerien elektrolyytiluonne mahdollistaa fysikaalisten hydrogeelien valmistamisen vastakkaisen varauksen omaavien ionien kanssa (Hoffman 2002). Esimerkiksi alginaattia on perinteisesti käytetty lääkeformulaatioiden lisääineena sen geeliä muodostavien ja stabiloivien ominaisuuksensa vuoksi. Alginaatti ja pektiini ovat polyanioneja ja kitosaani on polykationi. Näistä muodostettuja biohajoavia geelejä voidaan käyttää esimerkiksi sellaisissa lääkeformulaatioissa, joilla säädellään

lääkkeen vapautumista elimistössä tietyissä olosuhteissa kuten mahalaukun hampamassa ympäristössä (Bodmeier, Chen ja Paeratakul 1989; el Fattah ym. 1998) tai paikallisesti tietyissä kudoksissa kuten vaikkapa nivelerustossa (Mierisch ym. 2001). Niistä voidaan valmistaa myös sellaisia liuoksia, jotka muodostavat geelin vasta elimistöön annosteltuina esimerkiksi ruumiinlämmön vaikutuksesta (Chenite ym. 2000) tai mahalaukun hampamissa olosuhteissa (Miyazaki, Kubo ja Attwood 2000).

Alginaatin ja pektiinin geeliytämiseen on tavallisimmin käytetty kalsiumionia. Kitosaanin geeliytämiseen on käytetty muun muassa tripolyfosfaattia (Bodmeier, Chen ja Paeratakul 1989; Janes, Calvo ja Alonso 2001).

Kirjallisuudesta löytyy lukuisia näiden polymeeriliuosten fysikokemiallisia ominaisuuksia, viskositeettia ja geeliytyvyyttä käsitteleviä julkaisuja (Desbrieres 2002; Li ja Xu 2002; Singla ja Chawla 2001). Kiinnostus erityisesti kitosaanigeelien tutkimukseen on kasvanut voimakkaasti viime vuosina. Kitosaaniliuoksen viskositeetti kasvaa kitosaanikonsentraation ja deasetyylaatioasteen kasvaessa sekä lämpötilan laskiessa. Kitosaani on kuitenkin liikenematon alkalisessa ja neutraalissa pH:ssa, mikä saattaa toisinaan asettaa rajoituksia sen käytölle sellaisenaan.

Kitosaanista valmistettuja geelejä, niiden ominaisuuksia ja käyttösovelluksia on tutkittu paljon erilaisia lääkeformulaatioita ja hoitomuotoja kehiteltäessä. Esimerkiksi injektoitavaa kitinigeeliä on valmistettu kitosaania asetyloimalla (Gérentes ym. 2002). Yhä kasvavan mielenkiinnon vuoksi onkin jo käyty keskustelua kitosaanin ja alginaatin turvalliseen lääketieteelliseen käyttöön liittyvästä standardoinnista ja ohjeistuksesta (Dornish, Kaplan ja Skaugrud 2001).

On yleisesti tunnettua kirjallisuudessa, että kitosaania, alginaattia ja pektiiniä on käytetty erilaisina partikkeleina lääkeaineiden ja proteiinien kantoaineena (engl. *carrier*). Esimerkiksi sellainen suun kautta annosteltava lääkeaineen vapautumista säätelyvä formulaatio, jossa kitosaanin ja lääkeaineen seos on granuloitu tai pelletöity, on patenttoitu (Säkkinen ja Marvola 2001 patentti WO0176562). Vastaavanlaisissa tableteissa on käytetty myös kitosaanin ja alginaatin muodostamaa ionikompleksia (Takeuchi ym. 2000).

Lääkeaineiden partikkeleita tai kiteitä on myös kapseloitu (engl. *encapsulated*) pieniin pallomaisiin geelipartikkeleihin (engl. *beads*, *microspheres* tai *microparticles*), jotka on tavallisesti kovetettu tipauttamalla lääkeainetta sisältävästä polymeeriliuosta pisaroina vastaionia sisältävään liuokseen (Bodmeier, Chen ja Paeratakul 1989; Bodmeier ja Paeratakul 1989; Takka ja Acartürk 1999). Kitosaania on kapseloitu myös ionikompleksina glysiiniliuoksessa (Kofuji ym. 2001).

Vastaavasti on suoritettu niin solujen (Serp ym. 2000) kuin myös proteiinien kapselointia. Esimerkiksi albumiinia on kapseloitu kitosaanilla päälystettyihin pektiinipartikkeleihin kalsiumkloridiliuoksessa (Kim ym. 2003). Proteiinien kapselointia on suoritettu myös inkuboimalla proteiiniliuosta puolivalmiissa polymeerikapselisuspensiolla, jolloin kapselien sisältämä geeli on saatu täytymään proteiinilla. Tiourina ja Sukhorukov (2002) ovat osoittaneet  $\alpha$ -kymotryptsiini-entsyymin säilyttäneen hyvin aktiivisuutensa tällaisessa alginaatti-protamiini-kapselien suspensiolla. Myös proteiinikiteiden kapselointi polymeerikantoaineeseen on jo ennestään tunnettua tekniikkaa (Margolin ym. 2003 patentti US2003175239).

Geeliä tai partikkeleita muodostavan ominaisuuden lisäksi alginaatilla ja kitosaanilla tai niiden modifikaatioilla on mainittu myös useita muita edullisia ominaisuuksia kuten antioksidatiivisia (Schmidt 2003; Xue ym. 1998) ja antimikrobiaalisia (Huard ym. 2001 patentti US6197322; Jumaa, Furkert ja Muller 2002; Kim ym. 1999; Sakurada 1995 patentti JP7258972) vaikutuksia. Näiden ominaisuuksien vuoksi erityisesti kitosaania on ehdotettu käytettävän muun muassa säilöntääaineena tai terapeutisena materiaalina ihmisen hoitoon ja haavojen parantamiseen. Kitosaanin on havaittu nopeuttavan haavojen paranemista uuden ihosolukon muodostumista edistäen (Singla ja Chawla 2001) sekä elimistön omia puolustusmekanismeja kuten makrofageja aktivoiden (Ueno, Mori ja Fujinaga 2001).

Kationiluonne antaa kitosaanille bioadheesioon liittyvän erityisominaisuuden, jota on käytetty hyväksi limakalvojen kautta annosteltavien, esimerkiksi insuliinia tai muuta makromolekyyliä, peptidiä, proteiinia tai DNA:ta sisältävien lääkkeiden kehittelyssä (Fernandez-Urrusuno ym. 1999; Janes, Calvo ja Alonso 2001; van der Lubben ym. 2001; Takeuchi, Yamamoto ja Kawashima 2001; Thanou, Verhoef ja Junginger 2001).

Näiden polymeerien erilaisia käyttösovellutuksia löytyy lääketeollisuuden lisäksi paljon esimerkiksi elintarvike-, kosmetiikka-, tekstiili- ja paperiteollisuudesta. Kitosaanilla on lupaavia tulevaisuuden mahdollisuuksia, ei pelkästään geelinä tai lisääineena, vaan myös biologisesti aktiivisena aineena.

5

## **Proteiinikiteyksen tunnettua tekniikkaa**

Joitakin tietoja proteiinien kiteytyksestä on julkaistu jo 1800-luvulla. Lääketieteellisessä oppikirjassa vuodelta 1853 kuvallaan hemoglobiinin kiteyttäminen. Proteiinien kiteytys kasvoi 1920-luvulla nopeasti laajenevaan käyttöön. 1900- luvun alkupuolella kiteytystä käytettiin erityisesti proteiinien puhdistamiseen preparatiivisessa mittakaavassa. Viime vuosikymmeninä proteiinien kiteytystä on kehitetty ensisijaisesti molekyylirakenteiden tutkimista varten. Hyviä yleiskatsauksia proteiinien kiteytysmenetelmiin ja käytettyihin reagensseihin on julkaistu kirjoissa, joita ovat toimittaneet Alexander McPherson (1989), A. Ducruix and R. Giege (1992) ja Bergfors, T. M. (1999).

Kiteytyksen käyttö tuotannollisiin ja lääketieteellisiin tarkoituksiin on suhteellisesti katsoen vähentynyt samalla kun proteiinien kromatografinen puhdistus on voimakkaasti kehittynyt. Viime aikoina on kuitenkin noussut uusi kiinnostus proteiinien kiteytysmenetelmään lääketieteellistä formulointia varten.

Kuitenkaan useimmat kiteytysmenetelmät joita nykyisin käytetään rakennetutkimuksissa eivät ole laisinkaan sopivia lääketieteellisten tuotteiden valmistukseen. Näissä menetelmissä käytettäväät kiteytysreagenssit ovat fysiologisesti sopimattomia ja usein suorastaan myrkyllisiä. Lääketieteellisiin kiteytyksiin täytyy näin ollen valita sellaisia reagensseja jotka ovat sinällään elimistöön sopivia ja farmakopean mukaisesti hyväksyttyjä. Jotkin aineet ovat hyväksyttyjä ihonalaiseen tai suonensisäiseen injektioon, jotkin ainoastaan ruoansulatuskanavan kautta käytettäviksi.

Näin ollen farmakologinen hyväksyttävyys rajoittaa suuresti kiteytykseen käytettävissä olevien aineiden valikoimaa. Seuraavassa esitetään luettelomaisesti ryhmiteltynä joitakin proteiinien kiteytyksessä käytettyjen aineiden tai olosuhteiden perustyyppejä ja tarkastellaan niiden soveltuvuutta farmaseuttiseen käyttöön.

- 5 Epäorganisia suoloja, kuten ammoniumsulfaattia, natriumsulfaattia, fosfaatteja, litiumkloridia, natriumkloridia ja kaliumkloridia käytetään usein hyvin väkevinä 0.5 – 3 M liuoksina, jotka eivät ole farmakologisesti hyväksyttäviä. Alkoholit ja organiset liuottimet, kuten metanol, etanol, isopropanoli ja asetoni ovat hyviä kiteyttäjiä, mutta myrkkyllisiä. Synteettiset polymeerit, kuten lukuisat erilaiset polyetyleeniglykolit ja niiden johdannaiset ovat rajoitetusti soveltuvia synteettisen kemian tuotteita. Proteiinien kiteytykseen on käytetty näiden esimerkkien lisäksi tuhansia erilaisia reagensseja ja niiden yhdistelmiä. Hyvin harvat näistä reagensseista ovat lääketieteelliseen käyttöön tai elintarvikeprosesseihin soveltuvia.

- 10 Kirjallisuudessa väitetään yleisesti, että proteiinien kiteytys on vaikeaa ja edellyttää proteiinin hyvin suurta puhtautta. Proteiinin liuoksesta pitää poistaa kaikki vieraat aineet, erityisesti muut proteiinit ja polymeerit jotta kiteytys voisi lainkaan onnistua. Tämän yleisen periaatteen mukaisesti kiteytettävä proteiini puhdistetaan erittäin perusteellisesti esimerkiksi useilla peräkkäisillä kromatografiamenetelmillä. Puhdistamisen jälkeen liuokseen lisätään jotain edellä mainittua reagenssia, jolloin proteiini saattaa kiteytyä. Tämän kaltaisia menetelmiä on julkaistu tieteellisessä kirjallisuudessa kymmeniä tuhansia.

- 15 Tässä keksinnössä käytettyjen esimerkkiproteiinien kiteytyksiä on kuvattu kirjallisuudessa perusteellisesti. Abel julkaisi (1926) ensimmäisen insuliinin kiteytyksen. Myöhemmin Scott (1934) ja Schlichtkrull (1956 ja 1960) ovat 20 julkaisseet useita tutkimuksia insuliinin kiteytyksestä. Glukoosi-isomeraasin kiteytyksen on kuvannut patenteissa Visuri (1987 ja 1992) sekä tieteellisessä julkaisussa Vuolanto ym (2003). Törrönen A. ym. (1994) ovat kuvanneet ksylanaasin kiteytyksen.

## Kiteytys geeleissä

Röntgenkristallografiassa tarvittavien yksittäisten isojen proteiinikiteiden valmistusmenetelmiä geeleillä ovat kuvanneet julkaisuissaan Robert, M. C. ja 5 Lefauchcheux, F. (1988). sekä Robert, M. C. ym.(1992). Kuvatuilla menetelmillä proteiineja kiteytetään silikageelin tai agaroosigeelin kera. Näissä menetelmissä geelit eivät toimi kiteytysreagensseina vaan niiden tehtävänä on ensisijaisesti säädellä ja hidastaa kiteiden liian nopeata muodostumista. Proteiinien kiteyttäminen tehdään lisäämällä seokseen tunnetun tekniikan mukaisia kiteytysreagensseja.

10

## Tämän keksinnön eroavaisuuksia tunnettuun tekniikkaan

Tunnetussa tekniikassa käytetään puheena olevia polymeerejä yleensä proteiinihiukkosten tai kiteiden kapselointiin tai stabilointiin mm. kuivauksen yhteydessä. Tässä keksinnössä on kuitenkin kyseessä ainoastaan polymeerien geeliin 15 tai liuokseen perustuva menetelmä ja tuotemuoto. Keksinnön mukaisella menetelmällä ei pyritä kapseloimaan proteiineja, vaan kiteet ovat sellaisenaan vapaana polymeerin liuoksessa tai jatkuvassa tasaisessa geelissä. Keksinnön mukaisia kidesuspensioita ei kuivata.

Tämän keksinnön mukaisilla polymeeriliuoksilla tai niiden geeleillä tehtyjä 20 proteiinien tai polypeptidien kiteytyskäytäntöä ei tunneta aikaisemmassa kirjallisuudessa. Keksinnön mukainen ei-kapseloitu tuote on sellaisenaan käyttökelpoinen kiteisen makromolekyylin ja viskoosin liuoksen tai geelin tasalaatuinen seos, jota voidaan myös säilyttää tasalaatuisena sekoittamatta ja syöttää kohtuullisella paineella kapillaarin läpi.

25 Keksinnön mukaisena tavoitteena ovat seosolosuhteet, joissa proteiinien luonnolliset ominaisuudet säilyvät ennallaan. Tätä tavoitetta edistää se, että kiteisen proteiinin fysikaalinen ympäristö on hyvin samankaltainen kuin liukoiselle proteiinille.

Tämä keksintö eroaa oleellisilta osiltaan aiemmin tunnetuista tekniikoista joissa käytetään geelejä kiteytyksen apuvälineenä. Kyseisillä tunnetuilla menetelmillä pyritään kiteyttämään proteiinit hyvin hitaasti siten että muodostuu mahdollisimman vähän kideytimiä. Tällöin saadaan syntymään yksittäisiä isoja kiteitä. Kuvatuissa 5 menetelmissä muodostetaan geelistä ja proteiiniliuoksesta kaksi eri faasia jotka ovat kosketuksessa toisiinsa. Näissä tekniikoissa kiteytyminen saadaan aikaan nimen omaan lisäämällä geelifaasiin proteiinin kiteytymisen aiheuttava ennalta tunnettu reagenssi. Kiteytyminen tapahtuu hitaasti kun reagenssi ja proteiini sekoittuvat diffuusion avulla. Tunnetun tekniikan geeliä muodostavat aineet ovat erilaisia kuin 10 tämän keksinnön mukaiset polymeerit.

Kirjallisuudessa kuvattussa tekniikassa geelin muodostukseen käytetyt aineet eivät itsenäisesti toimi kiteyttävinä reagensseina. Niiden halutaan nimen omaan olevan mahdollisimman inerttejä ja reagointi kiteytettävän proteiinin kanssa nähdään haittana.

15 Tämän keksinnön mukaisesti polymeerit ja kiteytettävä proteiini sekoitetaan nopeasti keskenään ja kiteytyminen tapahtuu tasaisesti koko seoksessa. Vaihtoehtoisesti ennalta muodostetut kiteet sekoitetaan näihin polymeereihin. Geelin muodostuminen ei ole välttämätön edellytys tämän tekniikan hyötykäytölle.

Tämän keksinnön mukaisesti polymeerit voivat olla oleellisia aineita kiteiden 20 muodostumisessa. Monissa seuraavissa esimerkeissä polymeeri tai sen hydrolysaatti on suorastaan välttämätön reagenssi kiteiden tuottamisessa. Voidaan päättää että nämä polymeerit osallistuvat monin tavoin kiteytymiseen. Tätä päätelmiä tukee muun muassa yllättävä havainto, että proteiineista syntyy polymeereissä usein aivan erimuotoisia ja keskimäärin erikokoisia kiteitä kuin samoista proteiineista 25 kiteytettäessä aikaisemmin tunnetulla tekniikalla.

## Keksinnön kuvaus

Tämän keksinnön mukaisesti proteiinit tai polypeptidit kiteytetään liuoksessa joka sisältää valittuja hiilihydraattirunkoisia biologista alkuperää olevia polymerejä.

5 Keksinnön mukaisia polymerejä ovat alginaatti, dekstriini, pektiini ja kitosaani. Polymeerien molekyylikoko voi luonnostaan vaihdella niiden biologisesta alkuperästä ja puhdistusprosessista riippuen. Kaupallisesti on saatavissa saman tyyppisiä polymerejä, joilla on hyvin vaihteleva molekyylikoko. Yleisen käsityksen ja kokemuksen mukaan hiilihydraatit ja polysakkaridit suojaavat proteiineja ja edistävät niiden pysyvyyttä liukoisenä.

10

Nyt on yllättäen havaittu ja osoitettu kokeellisesti, että nämä polymeeriset aineet voivat edistää proteiinien ja peptidien kiteytymistä tai soveltuvat käytettäväksi kiteytyksen yhteydessä. Lisäksi on havaittu, että nämä polymeerit voivat olla myös osittain hydrolysoituja molekyylikoon pienentämiseksi. Keksinnön mukaisia polymerejä ja niiden hydrolysaatteja käyttäen voidaan valita monenlaisia kiteytysolosuhteita jolloin voidaan saavuttaa erilaisia hyödyllisiä tavoitteita. Eri tyyppisiä polymerejä voidaan myös tarkoitukseenmukaisesti yhdistellä.

- 15
- 20 Keksinnön mukaisilla polymeeriliuoksilla on kiteytetty ja seostettu useita erilaisia proteiineja, mm. glukoosi-isomeraasi, insuliini, ksylianaasi ja endoglukanaasi. Näin voidaan päätellä, että kyseisiä polymerejä voidaan edullisesti käyttää lukuisien eri proteiinien ja polypeptidien kiteytyksen yhteydessä.
- 25 Erityisen kiinnostavaa ja edullista on se, että voidaan valmistaa pieniä ja tasakokoisia kiteitä. Tällainen kidesuspensio on edullinen esimerkiksi tarkan annostelun kannalta.

Viskoosissa liuoksessa tai tiksotrooppisessa geelissä tällainen kidesuspensio on hyvin pysyvä.

- Näistä polymeereistä on myös valmistettu entsymaattisen hydrolyysin avulla 5 pienimolekyylisempää tuotteita, jotka ovat hyvin soveltuivia proteiinien kiteytykseen. Hydrolyysin avulla voidaan alentaa polymeeriliuoksen viskositeettia, mikä on eduksi esimerkiksi silloin kun päätavoitteena on proteiinin kiteyttäminen. Hydrolysoidusta polymeeristä voidaan tarvittaessa valmistaa väkevämpiä liuoksia kuin alkuperäisestä.
- 10 Alkuperäisiä suurimolekyylisiä polymeerejä on edullista käyttää silloin kun tavoitteena on geelimäinen tuote ja kiteiden laskeutumisen estäminen. Polyelektrolyyttisiä polymeerejä, kuten alginaattia ja pektiiniä voidaan geeliyttää lisäämällä sopivia vastaioneja, esimerkiksi kalsiumia. Polymeerien avulla voidaan säädellä kidesuspensioiden viskositeettia laajalla alueella. Näistä polymeerien 15 ominaisuuksista on paljon kirjallisuutta kuten edellä tunnetussa tekniikassa on mainittu.

### **Menetelmän etuja.**

Seuraavaksi kuvillaan joitakin keksinnön mukaisen menetelmän etuja.

20

### **Polymeerit kiteytysreagensseina**

Nämä polymeerit toimivat usein pääasiallisina proteiineja kiteyttävinä reagensseina, kuten esimerkit 12 – 65 osoittavat. Vastaavissa olosuhteissa pelkässä puskuriliuoksessa kiteytymistä ei tapahdu.

25

## Lääketieteellinen hyväksyttävyys

Polymeerit ovat lääketieteellisesti hyväksyttäviä aineita. Näin voidaan valmistaa kiteisiä lääkeainetuotteita esimerkiksi ihonalaista injektiota varten. Kiteytys voidaan tehdä hyvin alhaisessa suolapitoisuudessa. Kiteytyksessä ainoana suolana voi olla pH 5 säädössä käytetty laimea puskuriliuos, esimerkiksi fosfaatti. Polysakkarideilla on tunnetun tekniikan perusteella proteiineja stabiloiva vaikutus. Keksinnön mukaisessa lopullisessa koostumuksessa polymeerin kuiva-aineepitoisuus on alhainen, tavallisesti alle 5 painoprosenttia.

## 10 Edut lääkkeiden annostelussa

Kiteisten suspensioiden käyttöä vaikeuttaa tai rajoittaa yleensä kiteiden laskeutuminen ja sen seurauksena epähomogenisten suspensioiden muodostuminen. Tästä ovat esimerkkinä kaupalliset hidasvaikuttiset kiteiset insuliinivalmisteet, joita täytyy aina ravistella voimakkaasti ennen käyttöä. Polymeerit nostavat liuoksen viskositeettia ja niillä voi siten estää kiteiden laskeutumisen astian pohjalle. Näin voidaan lääkeainesuspensio pitää kauan homogenisena.

## Edut teollisuusentsyyymiä tuotannossa ja annostelussa

Useita teollisuusentsyyymejä voitaisiin edullisesti valmistaa ja varastoida kiteisinä jos 20 kiteet eivät sedimentoituisi. Kidesuspensionina voidaan teollisuusentsyyymejä varastoida ja käyttää hyvin väkevinä. Näin saavutetaan merkittäviä säästöjä. Nyt voidaan kiteisen valmisten edut saada käyttöön tämän keksinnön mukaisella menetelmällä

## Geeliytyys

Polymeeri voidaan tarvittaessa geeliyttää ennen proteiinin kiteytymistä, jolloin kiteytyminen tapahtuu tasaisesti vaikka panos pidetään sekoittamatta. Kiteytysolosuhteet voidaan säätää sellaisiksi, että kahden liuoksen yhdistäminen tuottaa tasaisen seoksen, jossa yhdistämisen jälkeen tapahtuu sekä geelin muodostuminen että proteiinin kiteytyminen ilman uusia reagenssilisäyksiä. Geelin viskositeetti voidaan säätää halutunlaiseksi tunnetulla tekniikalla. Keksinnön mukaisen geelin viskositeetti on riittävä estämään kiteiden laskeutumisen, mutta samalla sellainen, että geeliä voidaan syöttää kohtuullisella paineella ohuen kapillaarin läpi.

## Hidas liukoisuus

Yksi kiteisen proteiinin etu liukoiseen proteiiniin verrattuna on sen hitaampi ja pitkäkestoisempi vaikutus sen vaatiman liukemisajan vuoksi. Kiteisen proteiinin liukemisnopeuteen vaikuttaa fysikaalinen ja kemiallinen ympäristö sekä kidekoko. Jos kidekoko on tasainen, liukemisnopeus on ennustettavissa ja hallittavissa.

## Homogeeninen kidekoko

Kun proteiinin tai polypeptidin kiteytys suoritetaan liukoisena tai geeliytetyn polymeerin, polymeeriseoksen tai polymeerihydrolysaatin läsnäollessa, kiteytymisnopeudessa tai kiteiden koossa ja muodossa voidaan havaita eroavaisuuksia, jotka ovat edullisia tavanomaiseen liuokseen verrattuna. Keksinnön mukaisella liuos- tai geelikoostumuksella voidaan saada aikaan homogeeninen nukleaatio mikä johtaa tasaisen kidekoon muodostumiseen.

## Keksinnön edullinen suoritustapa

Kiteytettävä proteiini tai peptidi, liuotetaan puskurisuolaliuokseen. Edullinen puskuri on esimerkiksi laimea fosfaatti, jonka konsentraatio voi olla 20 – 50 mM. Tässä liuoksessa proteiinin ei tarvitse kiteytyä. Toisaalta proteiini voi tässä vaiheessa olla 5 kiteisenä jos se on lopputuotteen kannalta hyväksyttävää tai edullista.

Valmistetaan keksinnön mukaisesta polymeeristä, esimerkiksi pektiinistä, dekstriinistä, alginaatista, kitosaanista, polymeerin hydrolysaatista tai jostakin näiden seoksesta liuos veteen. Polymeerin edullinen pitoisuusalue on alempi kuin 10 %. Polymeerien hydrolysaateista voi valmistaa väkevämpää liuksia niiden 10 alhaiseman viskositeetin johdosta. Liuos voi sisältää polymeerin ohella ainetta joka helpottaa polymeerin liuottamista, esimerkiksi happamuuden säätöön tarvittavaa ainetta kuten asetaattia.

Valmistetaan proteiinin ja polymeerin liuoksista tasa-aineinen seos. Tämän jälkeen 15 tapahtuu proteiinin kiteytyminen. Panosta sekoitetaan jatkuvasti jos seoksen viskositeetti on suhteellisen alhainen. Jos viskositeetti on riittävän korkea, panosta ei tarvitse sekoittaa liuosten yhdistämisen jälkeen.

Haluttaessa voidaan tähän seokseen lisätä ainetta, joka geeliyttää käytetyn polymeerin tai säätää sen viskositeetin halutulle tasolle. Tällainen aine voi olla esimerkiksi jokin kahdenarvoinen kationi kuten kalsium-ioni. Vaihtoehtoinen 20 geeliyttäjä voi olla esimerkiksi sähkövaraukseltaan toisenlainen polymeeri. Sopivan polymeeriparin voi muodostaa esimerkiksi kitosaani ja alginaatti.

Proteiinin tai polypeptidin kiteytymisen edellytyksenä on se, että panoksen sekoittamisen jälkeen olosuhteet ovat hallitut. Seoksen happamuuden (pH) tulee olla sellainen, että kyseinen proteiini voi kiteytyä. Edullisin pH on erilainen eri 25 proteiineilla. Edullinen pH arvo saavutetaan käyttämällä proteiinin ja polymeerin liuoksissa tarkalleen annosteltuja puskuriaineita. Proteiinin kiteytyminen voi myös edellyttää jonkin erityisen reagenssin käyttöä. Tämän eksinnön mukaisesti itse polymeeri tai sen hydrolysaatti voi hyvin monissa tapauksissa yksinään toimia pääasiallisena kiteyttävänä reagenssina.

Seuraavat esimerkit valaisevat tarkemmin keksinnön toimivuutta ja etuja erilaisista lähtökohdista ja näkökulmista tarkasteltuna.

## 5 Esimerkit

### Esimerkki 1.

#### Ihmisen insuliinin kiteyttäminen 1,5 % natriumalginaattiliuoksessa

Kiteytettävänä materiaalina käytettiin ihmisen insuliinia. Tämä proteiini on tuotettu ilmentämällä ihmisen insuliinin geeni E. Colissa. Insuliinin toimittaja oli Sigma, 10 jonka luettelossa se on tuotenumeroilla I 0259. Kuivaa insuliinijauhetta liuotettiin 21,1 mg/ml happameen liuotusreagenssiin joka sisälsi 10 mM suolahappoa ja 3 mM sinkkikloridia.

Valmistettiin 3 % (w/w) natriumalginaatti (Fluka 71238) polymeeriliuos veteen. 450 mikrolitraan tätä polymeeriliusta lisättiin puskuriksi 50 mikrolitraa 4 M kalium natrium fosfaattia, jonka pH on 5,6. Sekoitettiin koeputkisekoittajalla puskuroitua alginaattiseosta ja samalla lisättiin 500 mikrolitraa insuliiniliusta, jonka proteiinipitoisuus oli 10,6 mg/ml. Loppuolosuhheet kiteytyspanoksessa olivat: 1,5 % natriumalginaattia; 0,2 M kalium natrium fosfaattia ja 5,3 mg/ml ihmisen insuliinia, 15 joka vastaa 145 kansainvälistä yksikköä (lyhennetään ky) per millilitra. Suolahapon loppupitoisuus on tällöin 2,5 mM ja sinkkikloridin 0,75 mM. Kiteytys tehtiin 20 huoneenlämmössä (25 °C).

Tällöin syntyi aluksi tasainen amorfinen valkoinen saostuma. Koeputki siirrettiin 25 keinutukseen. Noin kahden ja puolen tunnin kuluessa amorfinen sakka liukeni ja muodostui täysin kiteytynyt melko tasakokoinen kuutiomainen insuliinikidejoukko (Valokuva 1). Kuutiomaisten kiteiden särmän pituus oli tyypillisesti 10 – 15 mikrometriä valokuvasta 1 mitaten.

**Esimerkki 2.****Ihmisen insuliinin kiteyttäminen 1,5 % kalsiumalginaattigeelissä**

Kiteytettävänä materiaalina oli ihmisen insuliini kuten esimerkissä 1. Kiteytys tehtiin siten että kalsiumalginaattigeeli muodostui lopullisessa seoksessa ennen insuliinin kiteytymistä.

Kuivaa insuliinijauhetta liuotettiin 20 % (v/v) etikkahappoon niin, että insuliinipitoisuudeksi tuli 16,7 mg/ml. 200 mikrolitraa tästä liuosta laimennettiin lisäämällä 85 mikrolitraa vettä. Tähän insuliiniliuokseen lisättiin 70 mikrolitraa 0,1 M kalsiumkloridia.

- 10 Natriumalginaattiliuos valmistettiin erikseen sekoittamalla 1,5 millilitraa 2 % (w/w) natrium-alginaattia, 140 mikrolitraa 1 M natriumhydroksidia ja 5 mikrolitraa 0,25 M sinkkikloridia. Kalsiumkloridipitoinen insuliiniliuos lisättiin alginaattiliuokseen huoneenlämmössä magneettisekoittimella samalla hyvin sekoittaen, jolloin muodostui nopeasti kalsiumalginaattigeeli.
- 15 Lopulliset kiteytysolosuhteet olivat: 1,67 mg/ml insuliini, 2 % etikkahappo, 70 mM natriumhydroksidi, 0,625 mM sinkkikloridi, 1,5 % natrium-alginaatti, 3,5 mM kalsiumkloridi. Näin valmistettiin kirkas, melko homogeeninen ja jähmeä geeli, joka samentui nopeasti. Geelin annettiin olla sekoittamatta huoneenlämmössä 3 päivää. Insuliini kiteytyi geelissä (pH 4,1) pieninä, tasakokoisina neuloina ja neulakimppuina (Valokuva 2). Yksittäisten kideneulasten tyypillinen paksuus oli  $1,5 \mu\text{m}$  ja pituus  $25 \mu\text{m}$ . Kiteet eivät laskeutuneet tässä geelissä. Jos olosuhteet ovat muuten samat, mutta natriumalginaattia ei ole lisätty, insuliini ei kiteydy ja liuos pysyy kirkkaana. Tästä voidaan päätellä, että yllättävästi alginaatti aiheuttaa insuliinin kiteytymisen.

**Esimerkki 3.****Ihmisen insuliinin kiteyttäminen 0,9 % kalsiumalginaattigeelissä**

Kiteytettävänä materiaalina oli ihmisen insuliini kuten esimerkissä 2. Kiteytys tehtiin kalsiumalginaattigeelissä.

Insuliinijauhetta liuotettiin 20 % (v/v) etikkahappoon niin, että insuliinipitoisuudeksi tuli 16,7 mg/ml. 200 mikrolitraan tästä liuosta lisättiin 85 mikrolitraa vettä ja 70 mikrolitraa 0,1 M kalsiumkloridia. Tämä liuos sekoitettiin 1,645 millilitraan 85,1 mM natriumhydroksidia ja 0,76 mM sinkkikloridia sisältävää liuosta, jolloin seoksen pH:ksi saatiin 4,0.

Seoksesta tehtiin geeli lisäämällä siihen magneettisekoittimella sekoittaen 900 mikrolitraa 3 % (w/w) natriumalginaattiliuosta. Lopulliset kiteytysolosuhteet olivat: 1,15 mg/ml insuliini, 1,4 % etikkahappo, 48 mM natriumhydroksidi, 0,431 mM sinkkikloridi, 0,9 % natrium-alginaatti, 2,4 mM kalsiumkloridi.

10 Syntynyt geeli oli sameaa, ja vähemmän viskoosia kuin esimerkissä 2. Geelin annettiin olla sekoittamatta huoneenlämmössä 3 päivää. Insuliini kiteytyi geelissä pieninä, tasakokoisina neuloina ja neulakimppuina (Valokuva 3). Yksittäisten kideneulosten tyypillinen paksuus oli 1,5  $\mu\text{m}$  ja pituus 25  $\mu\text{m}$ . Kiteet eivät laskeutuneet tässä geelissä.

15

#### **Esimerkki 4.**

#### **Sian insuliinin kiteytys 0,45 %(w/w) kitosaanissa pH 5,0**

Kiteytettävä materiaalina käytettiin sian insuliinia (Calbiochem). Esimerkin 1 kaltaisesti 49 mg kuivaa insuliinijauhetta liuotettiin 4 millilitraan hapanta liuotusreagenssia joka sisälsi 10 mM suolahappoa ja 3 mM sinkkikloridia. 20 Valmistettiin 0,9 % (w/w) kitosaaniliuos 0,28 M asetaattipuskuriin pH 5. Kitosaanin toimittaja oli Sigma, jonka luettelossa se on tuotenumeroilla C-3646.

1 millilitraan kitosaaniliuosta lisättiin 1 millilitraa liuotettua sian insuliinia samalla koko ajan koeputkisekoittajalla sekoittaen. Lisäyksen jälkeen koeputki siirrettiin jatkuvaan keinutukseen huoneenlämmössä. Loppuolosuhteet kiteytyspanoksessa olivat: 0,45 %(w/w) kitosaania, 0,14 M natrium asetaattia pH 5 ja 6,1 mg/ml porsaan insuliinia. Suolahapon loppupitoisuus oli 5 mM ja sinkkikloridin 1,5 mM. Tuloksena saatiin vuorokauden kuluttua paljon pieniä sauvamaisia kiteitä. Panoksen kidesaanto

oli 92,7 % insuliinin kokonaismäärästä. Valokuvasta 4 mitaten kiteiden tyypillinen pituus oli välillä 5 – 10 mikrometriä ja paksuus 0,5 – 1 mikrometriä.

### **Esimerkki 5**

#### **Sian insuliinin kiteytys 0,35 % (w/w) kitosaanissa pH 5,6**

- 5 Tässä esimerkissä käytettiin samanlaista sian insuliinin liuosta kuin esimerkissä 4. Valmistettiin 0,9 % (w/w) kitosaaniliuos 0,66 M asetaattipuskuriin pH 5,6.

100 mikrolitraan näin valmistettua kitosaaniliuosta lisättiin 100 mikrolitraa liuotettua sian insuliinia koeputkisekoittajalla sekoittaen. Loppuolosuhheet kiteytyspanoksessa olivat: 0,35 % (w/w) kitosaani; 0,33 M natrium asetaatti pH 5,6 ja 6,1 mg/ml sian insuliini. Suolahapon loppupitoisuus 5 mM ja sinkkikloridin 1,5 mM. Tässä kokeessa muodostui runsaasti kuutiomaisia kiteitä (samanlaisia kuin kuvassa 1) vuorokaudessa. Kidesaanto määritetynä liukoisuusmittauksella oli 98,8 %.

### **Esimerkki 6**

#### **Ihmisen insuliinin kiteytys 0,45 % kitosaanissa pH 5,0**

- 15 Kokeessa käytettiin samaa ihmisen insuliinia kuin esimerkissä 1. Jauhe liuotettiin samalla tavalla siten että insuliinin pitoisuudeksi tuli 21,1 mg/ml. Valmistettiin 0,63 % (w/w) kitosaaniliuos jonka asetaattipitoisuus oli 0,1M ja pH 5,0.

Kiteytyspanos valmistettiin sekoittamalla 355 mikrolitraa kitosaaniliuosta ja 145 mikrolitraa insuliiniliuosta. Loppuolosuhdeksi saatiin: 0,45 % kitosaania, 0,07 M natrium asetaattia pH 5,0 ja 6,1 mg/ml insuliinia. Suolahapon loppupitoisuus oli 2,9 mM ja sinkkikloridin 0,9 mM. Tulokseksi saatiin runsaasti tiimalasin ja kartion muotoisia kiteitä jotka muodostuivat vuorokauden kuluessa (Valokuva 5). Tiimalasin muotoisten kiteiden tyypillinen pituus oli 50  $\mu\text{m}$  ja pienempien kidekartioiden koko välillä 10 – 25  $\mu\text{m}$ . Tästä voidaan havaita, että kitosaani vaikuttaa yllättävästi kiteiden kasvun mekaniikkaan tuottaen tulokseksi muodoltaan aivan toisenlaisia kiteitä kuin on nähty tunnetun tekniikan menetelmillä.

## Esimerkit 7 ja 8

### Sian insuliinin kiteytys kitosaanin ja natriumalginaatin seoksissa:

#### Esimerkki 7

Kiteytettävänä materiaalina oli sian insuliini. Kiteytys tehtiin kitosaanin ja alginaatin 5 seoksen muodostamassa geelissä.

Kuivaa insuliinijauhetta liuotettiin 0,1 M etikkahappo, 3 mM sinkkikloridi -liuokseen niin, että insuliinipitoisuudeksi tuli 12,4 mg/ml. 300 mikrolitraan tästä liuosta lisättiin 500 mikrolitraa 1 % (w/w) kitosaaniliuosta 0,1 M etikkahapossa. Tähän insuliinin ja 10 kitosaanin seokseen lisättiin välittömästi 700 mikrolitraa 1,3 % (w/w) natriumalginaattiliuosta samalla magneettisekoittimella hyvin sekoittaen. Näin valmistettiin helposti juokseva, kirkas geeli (pH 4,3). Geelin annettiin olla sekoittamatta huoneenlämmössä 3 päivää jolloin insuliini kiteytyi ohuina neuloina joiden paksuus oli 2-3  $\mu\text{m}$  ja pituus 30-50  $\mu\text{m}$ . Lopulliset kiteytysolosuhteet olivat: 15 2,5 mg/ml insuliini, 0,3 % kitosaani, 0,6 % natrium-alginaatti, 53 mM etikkahappo, 0,6 mM sinkkikloridi, pH 4,3.

#### Esimerkki 8

Kiteytettävänä materiaalina oli sian insuliini kuten esimerkissä 7. Tässä esimerkissä kitosaanin pitoisuus oli huomattavasti korkeampi ja alginaatin pitoisuus alhaisempi 20 kuin esimerkissä 7.

Kiteytys tehtiin sekoittamalla kaksi liuosta (1) ja (2):

Liuos (1): 1,4 mg/ml insuliini, 0,89 % (w/w) kitosaani, 0,1 M etikkahappo, 0,34 mM sinkkikloridi. Liuos (2): 3,6 % (w/w) natriumalginaatti, 0,48 M natriumhydroksidi.

4500 mikrolitraa liuosta (1) lisättiin huoneenlämmössä 457 mikrolitraan liuosta (2) 25 jota samalla sekoitettiin huolellisesti. Näin valmistettiin samea geeli, jonka annettiin olla sekoittamatta huoneenlämmössä yön yli. Insuliini kiteytyi geelissä pieninä

kuutio- ja prismakiteinä joiden läpimitta oli 10 – 15  $\mu\text{m}$  (Valokuva 6). Lopulliset kiteytysolosuhteet olivat: 1,3 mg/ml insuliini, 0,8 % kitosaani, 0,2 % natriumalginaatti, 91 mM etikkahappo, 44 mM natriumhydroksidi, 0,3 mM sinkkikloridi, pH 5,3.

5

### **Esimerkit 9 ja 10**

#### **Sian insuliinin kiteytys glysiinin ja kitosaanin muodostamassa geelissä**

##### **Esimerkki 9**

Kiteytettävänä materiaalina oli sian insuliini. Kiteytys tehtiin glysiinin ja kitosaanin muodostamassa geelissä. Insuliinia liuotettiin 0,1 M etikkahappo, 3 mM sinkkikloridi- liuokseen niin, että insuliinipitoisuudeksi tuli 12,4 mg/ml. 300 mikrolitraan tästä insuliiniliuosta lisättiin 1,5 millilitraa 1 % (w/w) kitosaaniliuosta 0,1 M etikkahapossa.

Tähän insuliinin ja kitosaanin liuokseen lisättiin hyvin sekoittaen 500 mikrolitraa 1,05 M glysiini, 0,2 M natriumhydroksidipuskuria (pH 9,0), jolloin seoksen pH oli 5,5. Muodostunutta viskoosia geeliliuosta sekoitettiin kunnes se oli kirkas ja tasainen. Sen jälkeen sen annettiin olla sekoittamatta huoneenlämmössä, jolloin se pysyi kirkkaana useita tunteja. Seuraavana päivänä insuliini oli kiteytynyt keskimäärin 20  $\mu\text{m}$  läpimittaisina prismakiteinä (kuva 7). Lopulliset kiteytysolosuhteet olivat: 1,61 mg/ml insuliini, 0,65 % kitosaani, 78 mM etikkahappo, 0,391 mM sinkkikloridi, 228 mM glysiini, 43 mM natriumhydroksidi.

##### **Esimerkki 10**

Esimerkki 9 toistettiin kemialliselta koostumukseltaan täsmälleen samalla tavoin. Tässä esimerkissä insuliinin kiteytyspanosta sekoitettiin voimakkaasti, jolloin se muuttui nopeasti sameaksi. Tuloksena saatiin suhteellisen pieniä, 4 - 5  $\mu\text{m}$

läpimittaisia insuliinin prismakiteitä (Valokuva 7). Esimerkit 9 ja 10 osoittavat että kiteiden kokoon geelissä voidaan vaikuttaa merkittävästi sekoituksella.

### **Esimerkit muiden proteiinien kiteyttämisestä polymereillä**

#### **5 Esimerkki 11**

##### **Glukoosi-isomeraasin kiteytys pektiinissä**

Kiteytettävänä materiaalina oli erittäin puhdas veteen diafiltroitu glukoosi-isomeraasi jonka systemaattinen nimi on D-xylose ketol-isomerase EC 5.3.1.5. Kiteytys tehtiin kalsiumpektiinigeelissä seuraavasti: Koeputkeen pipetoitiin 1 millilitra glukoosi-isomeraasin vesiliuosta (57 mg/ml). Liuokseen sekoitettiin 200 mikrolitraa 0,5 M Tris-HCl-puskuria pH 7,0 ja 800 mikrolitraa 4 % (w/w) pektiiniliuosta (pectin from citrus peel, Fluka). Pektinin ja glukoosi-isomeraasin liuoksesta valmistettiin kirkas, homogeeninen ja melko jähmeä geeli sekoittamalla siihen 500 mikrolitraa 1 M kalsiumkloridia. Geeli siirrettiin kylmään (5 °C), missä sen annettiin seistä sekottamatta.

Geeli samentui 30 minuutin aikana. Mikroskoopilla tarkasteltaessa nähtiin glukoosi-isomeraasin kiteytyneen tasakokoisina sauvamaisina kiteinä. Kiteytymisen annettiin edetä yön yli. Valokuva 8 on otettu 20 tunnin kuluttua aloituksesta ja siinä kiteet ovat keskimäärin  $25 \mu\text{m}$  pituisia. Lopulliset kiteytysolosuhteet olivat: 23 mg/ml glukoosi-isomeraasi, 40 mM Tris-HCl pH 7, 1,3 % pektiini, 200 mM kalsiumkloridi. Kiteet eivät laskeudu tässä geelissä.

Glukoosi-isomeraasin kiteytyminen on huomattavasti hitaampaa ja syntyneet kiteet ovat suurempia monikulmioita (Valokuva 9), jos pektiiniä ei ole lisätty. Ilman kalsiumkloridia glukoosi-isomeraasi ei kiteydy vastaavissa olosuhteissa.

**Esimerkit 12 --- 38****Glukoosi-isomeraasin kiteyttäminen alginaatissa ja alginaattihydrolysaatissa**

Kiteytysreagensiksi soveltuват alginaattihydrolysaatit valmistettiin entsymaattisella menetelmällä. Esimerkissä käytetyn entsyymin tuotetiedot: entsyymin nimi on 5 alginaattilyaasi, aktiivisuus 2630 U/g, tuottajaorganismi *Flavobacterium multivolum*, toimittaja Sigma, tuotenumero A 6973. Natriumalginaatin 8 %(w/w) vesiliuosta hydrolysoitiin alginaattilyaasilla 20 tuntia 40 asteen lämpötilassa. Hydrolysointi tehtiin eriasteisesti käytämällä eri määriä entsyymiä suhteessa alginaattiin. Entsyyminmäärit olivat 0,9 mg – 9,5 mg per gramma alginaattia. Hydrolyysi 10 keskeytettiin keittämällä seoksia 20 minuutin ajan vesihautteella. Tämän jälkeen hydrolysaatit suodatettiin paperilla kiintoaineksen poistamiseksi. Näin valmistettuja alginaatin hydrolysaatteja käytettiin väkevyydeltään erilaisina liuoksina kiteyttämään proteiineja mikrodiffluusiomenetelmällä.

Kiteytettävänä materiaalina oli erittäin puhdas veteen diafiltritu glukoosi- 15 isomeraasi. Kiteytys suoritettiin +5 °C lämpötilassa mikrodiffluusiomenetelmällä sekoittaen reagensit aluksi siten, että niiden pitoisuus oli puolet siitä mitä seuraavissa taulukoissa on ilmoitettu loppupitoisuudeksi. Kunkin kokeen aikana sekä proteiini että polymeeri väkevöityvät veden haihtumisen johdosta siten, että 20 saavutetaan taulukossa ilmoitettu loppupitoisuus. Kunkin esimerkin alkutilavuus oli 10 mikrolitraa ja lopputilavuus 5 mikrolitraa. Tämän väkevöitymisen seurauksena olosuhteet muuttuvat otollisiksi proteiinien kiteytymiselle.

Nämä esimerkit tuottivat isomeraasille tyypillisiä monisärmäisiä (esimerkiksi valokuva 9) tai kaksoispyramidin muotoisia kiteitä. Samanlainen prosessi voidaan toistaa haluttaessa suuremmassa mittakaavassa haihduttamalla tai muulla 25 tavaramaisella vedenpoistomenetelmällä.

**Taulukko 1. Esimerkit 12 - 38**

Esimerkki No	Glukoosi- isomeraasin loppupitoisuus mg/ml	Alginaatin pitoisuus %	Hydrolyysiaste mg entsyymiä/g alginaattia	50 mM fosfaatti pH	Tulos
12	57	1	0,9	6,2	kiteytyi
13	"	2	"	6,2	kiteytyi
14	"	4	"	6,2	kiteytyi
15	"	1	"	8,2	kiteytyi
16	"	2	"	8,2	kiteytyi
17	"	4	"	8,2	kiteytyi
18	"	1	2,4	6,2	kiteytyi
19	"	2	"	6,2	kiteytyi
20	"	4	"	6,2	kiteytyi
21	"	1	"	8,2	kiteytyi
22	"	2	"	8,2	kiteytyi
23	"	4	"	8,2	kiteytyi
24	"	1	4,7	6,2	kiteytyi
25	"	2	"	6,2	kiteytyi
26	"	4	"	6,2	kiteytyi
27	"	1	"	8,2	kiteytyi
28	"	2	"	8,2	kiteytyi
29	"	4	"	8,2	kiteytyi
30	"	1	9,5	6,2	kiteytyi
31	"	2,5	"	6,2	kiteytyi
32	"	5	"	6,2	kiteytyi
33	"	1	"	8,2	kiteytyi
34	"	2,5	"	8,2	kiteytyi
35	"	5	"	8,2	kiteytyi
36	54	1	ei hydrolysoitu	7	kiteytyi
37	"	3	ei hydrolysoitu	7	kiteytyi
38	"	5	ei hydrolysoitu	7	kiteytyi

**Esimerkit 39 - 41****Glukoosi-isomeraasin kiteytyks pektiinillä**

Kiteytettävänä proteiinina käytettiin samaa glukoosi-isomeraasia kuin esimerkeissä 12 – 38. Kiteytyks suoritettiin mikrodifluusiomenetelmällä samoin kuin esimerkeissä

5 12-38.

Kiteet 4 %:lla pektiinillä (pectin from citrus peel, Fluka) muodostuvat huoneen lämmössä. Kiteet alemilla pektiinitasoilla 1 % ja 2 % muodostuvat 7 asteen lämpötilassa. Nämä esimerkit osoittavat, että glukoosi-isomeraasin voi kiteyttää käyttäen ainoastaan pektiiniä kiteytsreagenssina. Samoissa olosuhteissa 20 mM 10 fosfaattipuskurissa pH 7 ilman pektiiniä glukoosi-isomeraasi ei kiteydy.

**Taulukko 2. Esimerkit 39 - 41**

Esimerkki No	Glukoosi-isomeraasin loppupitoisuus mg/ml	Pektiinin pitoisuus %	20 mM fosfaatti pH	Tulos
39	54	1 %	7	kiteytyi
40	"	2 %	7	kiteytyi
41	"	4 %	7	kiteytyi

**Esimerkit 42 - 47****Ksylanaasin kiteytys alginaatin hydrolysaateissa**

Kiteytettävänä proteiinina käytettiin ksylanaasia. Tämä ksylanaasi on tuotettu *Trichoderma sp* organismilla ja tunnetaan kirjallisudessa systemaattisella nimellä 5 endo-1,4- $\beta$ -xylanase EC 3.2.1.8.. Kiteytys suoritettiin mikrodiffuusiomenetelmällä 5 asteen lämpötilassa alginaatin hydrolysaateissa samoin kuin esimerkeissä 12-38. Ksylanaasi ei kiteydy vastaavissa olosuhteissa ilman alginaatin hydrolysaattia. Valokuva 11 esittää tyypillisiä näissä esimerkissä valmistettuja ksylanaasin kiteitä. Tyypilliset kiteet ovat suhteellisen ohuita levyjä, joiden paksuus on 5-10  $\mu\text{m}$  ja 10 särmien pituus 200 – 300  $\mu\text{m}$ .

**Taulukko 3. Esimerkit 42 - 47**

Esimerkki No	Ksylanaasin loppupitoisuus mg/ml	Alginaatin pitoisuus %	Hydrolyysiaste mg entsyymiä/ g alginaattia	50 mM fosfaatti pH	Tulos
42	31	1	0,9	8,2	kiteytyi
43	"	2	"	"	kiteytyi
44	"	5	"	"	kiteytyi
Valokuva 10					
45	"	2	2,4	"	kiteytyi
46	"	5	"	"	kiteytyi
47	"	5	4,7	"	kiteytyi

**Esimerkit 48 - 65****Glukoosi-isomeraasin kiteytyksessä pektiinin hydrolysaateilla**

Valmistettiin 2 % (w/w) liuos pektiinistä veteen. Tätä liuosta hydrolysoitiin 40 asteen lämpötilassa pektinaasientsyyymillä (Genencor International, Multifect PL)

5 eriasteisesti suhteuttamalla entsyyymimäärä pektiinin kuiva-aineeseen. Valmistettiin kaksi eriasteisesti hydrolysoitua erää, joista toinen hydrolysoitiin vain osittain ja toinen lähes loppuun asti. Entsyyymimäärat olivat 0,01 mg ja 0,1 mg per gramma pektiiniä. Hydrolyysi pysäytettiin keittämällä vesihautteessa 20 minuutin ajan. Pektiiniliuos suodatettiin kirkkaaksi, jäädytettiin ja kylmäkuivattiin.

- 10 Näin hydrolysoituja pektiinejä käytettiin eri pitoisuksissa kiteyttämään glukoosi-isomeraasia. Vastaavissa olosuhteissa ilman pektiinin hydrolysaatteja glukoosi-isomeraasi ei kiteydy. Kiteytysesimerkit tehtiin mikrodiffuusiokokeina 6 asteen lämpötilassa. Kokeissa valmistetut kiteet olivat hyvälaatuisia prismoja, joiden särmiin tyypillinen pituus oli 100 – 200 mikrometriä. Kiteiden muoto ilmenee 15 havainnollisesti valokuvasta 11.

**Taulukko 4. Esimerkit 48 - 65**

Esimerkki No	Glukoosi- isomeraasin loppupitoisuus	Pektiinin pitoisuus %	Hydrolyysiaste mg entsyymiä/ g pektiiniä	50 mM fosfaatti pH	Tulos
48	49 mg/ml	1	0,01	6,4	kiteytyi
49	"	3	0,01	6,4	kiteytyi
50	"	3	0,01	6,8	kiteytyi
51	"	3	0,01	7,2	kiteytyi
52	"	3	0,1	6,4	kiteytyi
53	"	3	0,1	6,8	kiteytyi
54	"	3	0,1	7,2	kiteytyi
55	"	5	0,01	6,4	kiteytyi
56	"	5	0,01	6,8	kiteytyi
valokuva 11					
57	"	5	0,01	7,2	kiteytyi
58	"	5	0,1	6,8	kiteytyi
59	"	5	0,1	7,2	kiteytyi
60	"	9	0,01	6,4	kiteytyi
61	"	9	0,01	6,8	kiteytyi
62	"	9	0,01	7,2	kiteytyi
63	"	9	0,1	6,4	kiteytyi
64	"	9	0,1	6,8	kiteytyi
65	"	9	0,1	7,2	kiteytyi

### **Esimerkit 66 – 79 Ihmisen insuliinin kiteytys pektiinin hydrolysaateissa**

Kiteytysesimerkit tehtiin mikrodiffuusiokokeina huoneenlämmössä samalla suoritustekniikalla kuin esimerkit 12 --- 38. Monissa kokeissa kiteet syntyivät jo noin tunnin kuluttua pipetoinnista eli ennen tasapainotilaa, joten olosuhteet 5 muistuttivat kiteyttyshetkellä enemmän panoskoetta kuin mikrodiffuusiokoetta. Kiteet olivat joko pieniä neuloja ja neulakimppuja tai prismoja. Valokuvan 12 esittämien kideneulojen tyyppilliset mitat ovat: paksuus 1-2  $\mu\text{m}$  ja pituus 20 – 30  $\mu\text{m}$ .

**Taulukko 5. Esimerkit 66 - 79**

Esimerkki No	Insuliinin loppupitoisuus mg/ml	Pektiinin pitoisuus %	Hydrolyysiaste mg entsyymiä/ g pektiiniä	50 mM fosfaatti pH	Tulos
66	4	3	0,01	5,0	kiteytyi
67	"	3	0,01	7,7	"
68	"	3	0,1	5,0	"
69	"	3	0,1	7,7	"
70	"	5	0,01	5,0	"
71	"	5	0,01	6,6	"
72 valokuva 12	"	5	0,1	5,0	"
73	"	5	0,1	6,6	"
74	2	9	0,01	5,0	"
75	"	9	0,01	6,6	"
76	"	9	0,01	7,7	"
77	"	9	0,1	5,0	"
78	"	9	0,1	6,6	"
79	"	9	0,1	7,7	"

### Esimerkit 80 - 84

#### Insuliinin kiteyttäminen dekstriinillä, pektiinillä sekä natriumalginaatin ja pektiinin seoksella

Seuraavissa esimerkeissä käytettiin kiteytettävänä proteiinina ihmisen insuliinia.

- 5 Liuos sisälsi 4 mg/ml insuliinia, 2,5 mM HCl ja 0,75 mM ZnCl<sub>2</sub>. Kiteytysesimerkit tehtiin mikrodiffuusiookeina huoneenlämmössä. Maissitärkkelyksestä valmistettu dekstriini oli Flukan tuote no 31412. Natriumalginaatti ja pektiini olivat samoja kuin esimerkeissä 1 ja 39 - 41. Insuliini kiteytyi dekstriinillä levymäisinä kiteinä kun taas pektiinipitoiset liuokset kiteyttivät insuliinin neulamaisessa kidemuodossa.

10

#### Taulukko 6. Esimerkit 80 - 84

Esimerkki No	Insuliinin loppupitoisuus mg/ml	Kiteyttävä polymeeri ja pitoisuus %	40 mM fosfaatti pH	Tulos
80	4,0	10 % Dekstriini 15	5,0	kiteytyi levyinä
81	"	20 % Dekstriini 15	5,0	kiteytyi levyinä
82	"	30 % Dekstriini 15	5,0	kiteytyi levyinä
83	"	2 % Pektiini	5,0	kiteytyi neuloina
84	"	0,5 % Natrium alginaatti ja 1 % Pektiini	5,0	kiteytyi neuloina

15

## Esimerkit 85 - 88.

### Kidepitoisten geelien viskositeetti

- Hyvin hyödyllinen ominaisuus on se, että muodostunut polymeerin ja kiteiden seos on viskositeettityypiltään tiksotrooppinen. Tämä tarkoittaa sitä, että liuoksen viskositeetti alenee kun leikkausnopeus kasvaa. Tästä seuraa, että kun seosta varastoidaan liikkumattomassa astiassa, se muuttuu hyvin nopeasti kiinteäksi geeliksi, jossa kiteet eivät laskeudu. Kun seosta annostellaan ja pumpataan, niin jo suhteellisen vähäisellä voimalla se muuttuu nestemäiseksi ja helposti käsiteltäväksi. Nämä ominaisuudet ilmenevät kuviosta 1, jossa esimerkkien 85 ja 86 mukaisia seoksia on pumpattu erilaisilla paineilla kapillaariputken läpi. Kuviosta ilmenee, että painetta nostettaessa näytteen virtausnopeus kapillaarin läpi kasvaa jyrkkenevästi. Vertailuaineena käytetyn glyserolin virtausnopeus kasvaa lineaarisesti paineen kasvaessa, mikä merkitsee sitä että glyserolin viskositeetti pysyy vakiona tässä esimerkissä käytetyissä olosuhteissa.
- Glyserolin viskositeetti käsikirjan (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1994 CRC Press. Inc.) mukaan on huoneenlämmössä 934 mPa s. Vertailuaineen viskositeetin perusteella laskettiin kidesuspensioiden viskositeetti eri virtausnopeuksilla ja tulosten perusteella piirrettiin kuva 2. Tästä kuviosta ilmenee havainnollisesti se, että esimerkkisuspensioiden viskositeetti alenee hyvin jyrkästi silloin kun virtausnopeus kasvaa.
- Esimerkit 87 ja 88 valmistettiin siten, että savutettiin mahdollisimman korkea proteiinikiteiden pitoisuus ja samalla kuitenkin seos joka on pumpattavissa ohuen kapillaariputken, esimerkiksi injektioneulan läpi. Proteiinikiteiden pitoisuuden ylärajan määrää oleellisesti kiteiden nestepitoisuus. Kirjallisuuden perusteella tiedetään että eri proteiinien ja peptidien kiteet sisältävät merkittävästi erilaisia määriä emäliuosta, tavallisesti vettä ja veteen liuotettuja puskurisuoloja. Yksi gramma endoglukanaasin kiinteää kidemassaa voi sisältää proteiinia korkeintaan 358 mg. Näin ollen tämän proteiinin väkevimmät pumpattavissa tai injektoitavissa olevat liuokset ovat pakostakin tätä laimeampia. Esimerkeissä 87 ja 88 valmistettiin näytteet joissa oli 255 mg ja 272 mg endoglukanaasia millilitrassa kideseosta. Yllättävästi

voitiin havaita, että näiden suspensioiden virtausnopeudet pienillä paineilla olivat samaa suuruusluokkaa kuin esimerkeissä 85 ja 86, joissa endoglukanaasia oli vain 17,5 mg millilitrassa. Nämä suspesiot olivat siten hyvin helposti injektoitavia. Suspesiot muuttuivat kuitenkin kiinteiksi geeleiksi tunnin kuluessa siitä kun niiden 5 sekoittaminen lopetettiin. Geelit voi muuttaa jälleen juokseviksi sekoittamalla hyvin vähäisellä voimalla.

Esimerkit 87 ja 88 osoittavat, että silloin kun proteiinikiteiden pitoisuutta nostetaan, niin geeliaineen tarve koko seokselle laskettuna vähenee. Tämä on ymmärrettävissä siten, että polymeeriä voi olla ainoastaan kiteiden välisessä nestetilassa, joka vähenee 10 silloin kun kiteiden osuus kasvaa.

### **Esimerkki 85**

Tässä esimerkissä kuvillaan kiteisestä endoglukanaasista (endo-1,4- $\beta$ -glukanaasi, eli 1,4-(1,3; 1,4)- $\beta$ -D-Glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4, tuotettu *Melanocarpus albomyces* fermentaatiolla) ja alginaatista valmistettu geeli joka voidaan ajaa vähäisellä paineella hyvin ohuesta kapillaariputkesta läpi (Kuvio 1).

Geeli valmistettiin sekoittamalla keskenään kolme liuosta seuraavasti:

- 1) 1 ml 3 % natriumalginaattia, samoin kuin esimerkissä 1
- 2) 2 ml endoglukanaasin (35 mg/ml) kidesuspensiota 5 mM Na-asettaattipuskurissa 20 pH 4,1

Liuokset 1) ja 2) sekoitettiin keskenään tasaiseksi kidesuspensioksi

- 3) 1 ml 14 mM CaCl<sub>2</sub> lisättiin vähitellen ja samalla voimakkaasti sekoittaen edelliseen seokseen.

Näin valmistettu kidesuspensio on geelimäinen ja hyvin pysyvä. Kiteet eivät laskeutuneet säilytysastian pohjalle 2 viikon tarkasteluajan kuluessa. 25 Geelimäisyystä huolimatta suspensiota voidaan helposti sekoittaa ja pumpata

kapillaariputken läpi. Geeli muuttuu hyvin juoksevaksi vähäisellä sekoitusvoimalla. Suspensiota pumpattiin sisähalkaisijaltaan 0.48 mm ja pituudeltaan 42 mm pitkän teräsputken läpi. Käytettäessä 200 millibaarin painetta saavutettiin virtausnopeus 734  $\mu\text{l}/\text{min}$ , mikä lineaariseksi virtauksekseen muutettuna on 400 cm/min.

- 5 Esimerkin mukainen kiteistä entsyyymiä sisältävä seos pysyy tasaisena suspensiona geelimäisyydestä johtuen, mutta on kuitenkin hyvin tehokkaasti ja helposti pumpattavissa ohuenkin putken läpi.

### **Esimerkki 86**

- 10 Tämä esimerkki on suoritustavaltaan samanlainen kuin edellinen esimerkki 85. Tässä muutettiin vain  $\text{CaCl}_2$  pitoisuutta korkeammaksi:

Geeli valmistettiin sekoittamalla keskenään kolme liuosta seuraavasti:

- 1) 1 ml 3 % natriumalginaattia
- 2) 2 ml endoglukanaasin (35 mg/ml) kidesuspensiota 5 mM Na-asetaattipuskurissa  
15 pH 4,1

Liuokset 1) ja 2) sekoitettiin keskenään tasaiseksi kidesuspensioksi

- 3) 1 ml 16 mM  $\text{CaCl}_2$  lisättiin vähitellen ja samalla voimakkaasti sekoittaen edelliseen seokseen.

- 20 Näin valmistettu kidesuspensio on geelimäinen ja hyvin pysyvä samoin kuin edellisen esimerkin suspensio. Tällä seoksella oli kuitenkin korkeampi viskositeetti kuin esimerkissä 85, mikä ilmenee kapillaariputkikokeesta. Suspensiota pumpattiin sisähalkaisijaltaan 0.48 mm ja pituudeltaan 42 mm pitkän teräsputken läpi. Käytettäessä 200 millibaarin painetta saavutettiin virtausnopeus 531  $\mu\text{l}/\text{min}$ , mikä lineaariseksi virtauksekseen muutettuna on 290 cm/min (kuvio1).

### **Esimerkki 87**

#### **Väkevä kidesuspensio alginaattigeelissä.**

Alginaattigeeli valmistettiin sekoittamalla 10 ml 1,5 % sodiumalginaattia ja 10 ml 7 mM CaCl<sub>2</sub>. Endoglukanaasin kiteitä 5 mM Na-asettaattipuskurissa pH 4,1 suodatettiin vakuumisuotimella siten että kaikki vapaa puskuriliuos poistui ja muodostui kiinteä kidemassa. Kidemassan proteiinipitoisuus oli kuivaainemäärityn perusteella 358,2 mg / 1000 mg.

Sekoitettiin huolellisesti keskenään 2,042 g endoglukanaasin kidemassaa ja 0,418 g alginaattigeeliä. Näin valmistettiin tasainen maitomainen kidesuspensio joka on geelimäinen ja hyvin pysyvä. Seoksen endoglukanaasin pitoisuudeksi määritettiin 272 mg/ml. Alginaatin pitoisuus seoksessa oli 0,14 %. Suspensiota pumpattiin sisähalkaisijaltaan 0,48 mm ja pituudeltaan 42 mm pitkän teräsputken läpi. Käytettäessä 198 millibaarin painetta saavutettiin virtausnopeus 312 µl/min.

### **15 Esimerkki 88**

#### **Väkevä kidesuspensio alginaattigeelissä.**

Sekoitettiin huolellisesti keskenään 2,067 g endoglukanaasin kidemassaa ja 0,592 g alginaattigeeliä. kuten esimerkissä 87. Näin valmistettiin tasainen maitomainen kidesuspensio joka on geelimäinen ja hyvin pysyvä. Seoksen endoglukanaasin pitoisuudeksi määritettiin 255 mg/ml. Alginaatin pitoisuus seoksessa oli 0,18 %. Suspensiota pumpattiin sisähalkaisijaltaan 0,48 mm ja pituudeltaan 42 mm pitkän teräsputken läpi. Käytettäessä 208 millibaarin painetta saavutettiin virtausnopeus 471 µl/min.

## Kirjallisuusluettelo

1. Abel J (1926). Crystalline insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash) 12, 132.
- 5 2. Bergfors, Terese M. (1999). In *Protein Crystallization*, (ed. Terese M. Bergfors), pp. 41 – 61. International university Line, La Jolla California.
3. Bodmeier R, Chen H, Paeratakul O. A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 1989; 6(5): 413-417. Abstract.
- 10 4. Bodmeier R, Paeratakul O. Spherical agglomerates of water-insoluble drugs. *J Pharm Sci.* 1989 Nov;78(11):964-7. Abstract.
5. Borchard G, Junginger HE. Modern drug delivery applications of chitosan. 15 *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 52: 103.
6. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* 2000 Nov; 20 21(21):2155-2161.
7. Desbrieres J. Viscosity of semiflexible chitosan solutions: influence of concentration, temperature, and role of intermolecular interactions. *Biomacromolecules*. 2002 Mar-Apr;3(2):342-9.

8. Dornish M, Kaplan D, Skaugrud O. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides. American Society for Testing and Materials. Ann N Y Acad Sci. 2001 Nov;944:388-97.
- 5
9. Ducruix, A. and Giege, R. pp. 127 – 143. (1992). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins* Oxford University Press
- 10 10. el Fattah EA, Grant DJ, Gabr KE, Meshali MM. Physical characteristics and release behavior of salbutamol sulfate beads prepared with different ionic polysaccharides. Drug Dev Ind Pharm. 1998 Jun;24(6):541-7. Abstract.
- 15 11. Fernandez-Urrusuno R, Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. Pharm Res. 1999 Oct;16(10):1576-81. Abstract.
- 20 12. Gérentes P, Vachoud L, Doury J, Domard A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. Biomaterials 2002; 23: 1295-1302.
13. Hirano S. Chitin biotechnology applications. Biotechnol Annu Rev 1996; 2:237-58. Abstract.
- 25 14. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews 2002; 43:3-12.

15. Huard LS, Qin J, Sun T, Bevernitz KJ, Dutkiewicz J, Wallajapet PRR. Antimicrobial structures. 2001. Patent US6197322.
- 5      16. Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 47: 83-97.
- 10     17. Jumaa M, Ferkert FH, Muller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. Eur J Pharm Biopharm 2002 Jan; 53(1):115-23. Abstract.
- 15     18. Kim HJ, Lee HC, Oh JS, Shin BA, Oh CS, Park RD, Yang KS, Cho CS. Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. J Biomater Sci Polym Ed. 1999;10(5):543-56. Abstract.
19. Kim TH, Park YH, Kim KJ, Cho CS. Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro. International Journal of Pharmaceutics 2003; 250: 371-383.
- 20     20. Kofuji K, Ito T, Murata Y, Kawashima S. Biodegradation and drug release of chitosan gel beads in subcutaneous air pouches of mice. Biol Pharm Bull 2001 24(2): 205-208.
21. Li J, Xu Z. Physical characterization of a chitosan-based hydrogel delivery system. J Pharm Sci. 2002 Jul; 91(7):1669-77. Abstract.

22. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. Chitosan for mucosal vaccination. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 52: 139-144.
- 5      23. Margolin AL, Rakestraw SL, Khalaf NK, Shenoy BC, St Clair NL. Stabilized protein crystals, formulations comprising them and methods of making them. 2003. Patent US2003175239.
- 10     24. McPherson A.(1989). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. Robert E. Kriegler Publishing Company, Malabar, Florida.
- 15     25. Mierisch CM, Jordan LC, Balian G, Diduch DR. The use of calcium alginate in the treatment of articular cartilage defects. 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 25 – 28, 2001, San Francisco California. Poster.
- 20     26. Miyazaki S, Kubo W, Attwood D. Oral sustained delivery of theophylline using in-situ gelation of sodium alginate. Journal of Controlled Release 2000; 67: 275-280.
27. Robert, M. C. ja Lefauchcheux, F. (1988). J. Cryst. Growth, **90**, 358 – 367.
28. Robert, M. C., Provost, K. ja Lefauchcheux, F. (1992). Crystallization in Gels and Related Methods. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, edited by A. Ducruix and R. Giege, pp. 127 – 143. Oxford University Press.

29. Sakurada T. Composite raw material comprising chitosan and protein material. 1995. Patent JP7258972. Abstract.
- 5 30. Schlichtkrull J (1956). Insulin crystals. II. Shape of rhombohedral zinc-insulin crystals in relation to species and crystallization media. Acta Chem. Scand. 10, 1459.
31. Schlichtkrull J (1960). Insulin crystal suspensions having a protracted effect. Patent no. GB835638.
- 10
32. Schmidt RJ. Therapeutic compositions comprising modified polysaccharides. 2003. Patent WO03080135 (GB2386900), abstract.
33. Scott DA (1934). CCXI. Crystalline insulin. Biochem. J. 28, 1592.
- 15
34. Serp D, Cantana E, Heinzen C, von Stockar U, Marison IW. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. Biotechnology and bioengineering 2000 Oct 5; 70(1): 41-53.
- 20 35. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2001; 53: 1047-1067.

36. Säkkinen M, Marvola M. A peroral pharmaceutical formulation for controlled release of a drug. 2001. Patent WO0176562.
37. Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 47: 39-54.
38. Takeuchi H, Yasuji T, Yamamoto H, Kawashima Y. Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. Pharmaceutical Research 2000; 17(1): 94-99. Abstract.
39. Takka S and Acartürk F. Calcium alginate microparticles for oral administration: I: effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency. J Microencapsulation 1999; 16(3):275-90.
40. Thanou M, Verhoef J., Junginger H. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. Advanced Drug Delivery Reviews 2001; 52: 117-126.
41. Tiourina O. and Sukhorukov G. Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of  $\alpha$ -chymotrypsin and controlled release study. International Journal of Pharmaceutics 2002; 242: 155-161.

42. Tonnesen H., Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2002 Jul; 28(6): 621-30. Abstract.

5 43. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001; 52: 105-115.

44. Visuri, K.(1987) United States Patent No. 4,699,882 Stable glucose isomerase concentrate and a process for the preparation of thereof

10 45. Visuri, K. (1992) United States Patent No. 5,120,650 Method for producing crystalline glucose isomerase

15 46. Vuolanto, A.; Uotila, S.; Leisola, M.; Visuri, K. (2003) Solubility and crystallization of xylose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*, *J. Cryst. Growth* 257:403-411.

20 47. Xue C, Yu G, Hirata T, Terao J, Lin H. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998 Feb;62(2):206-9. Abstract.

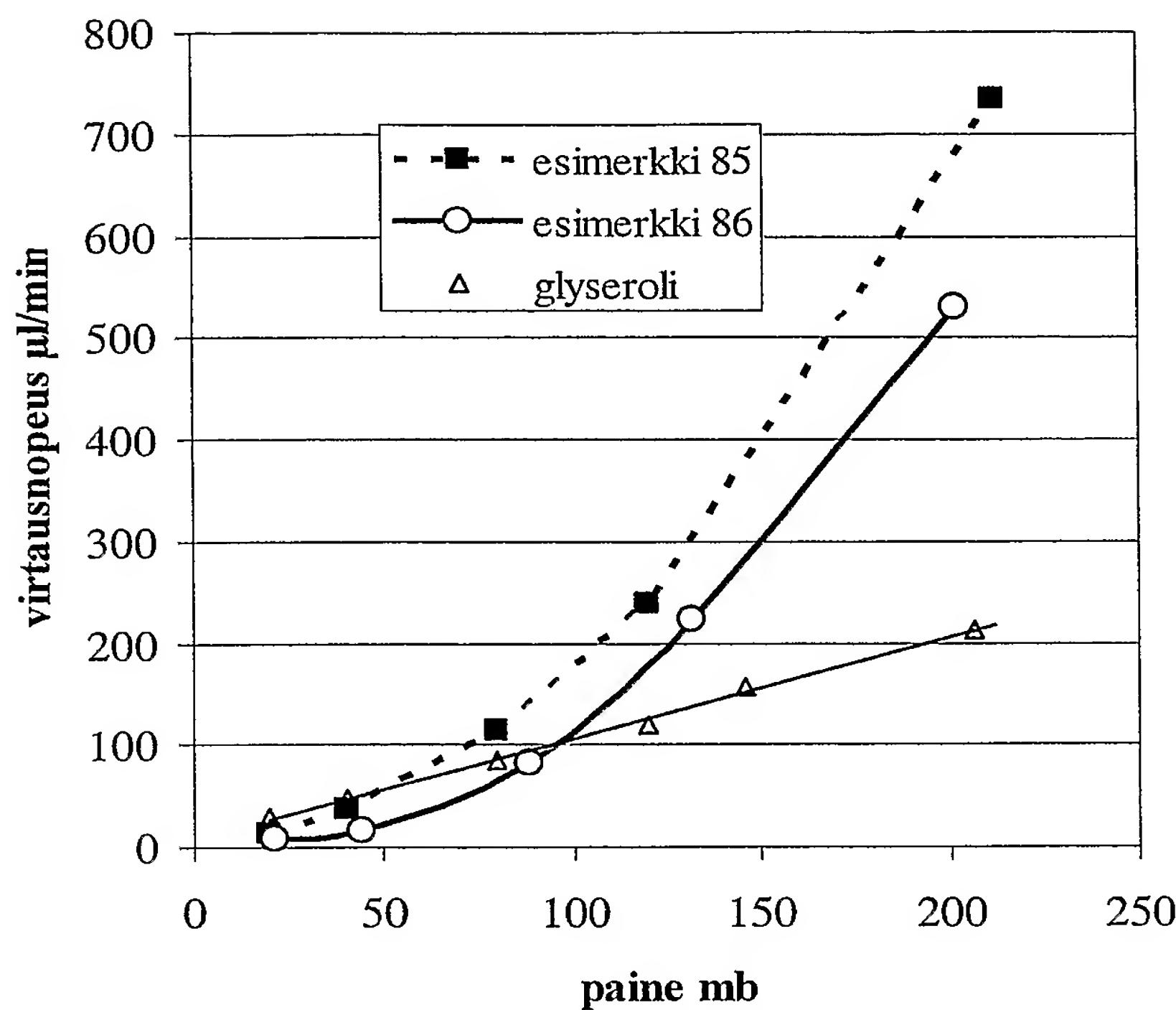
48. Törrönen, A., Harkki, A. and Rouvinen, J. (1994) Three-dimensional structure of endo-1,4- $\beta$ -xylanase II from *Trichoderma reesei* : two conformational states in the active site. *The EMBO Journal* Vol. 13, no. 11, pp. 2493 – 2501

## Vaatimukset

1. Menetelmä proteiinien ja peptidien kiteyttämiseksi tai valmiiden kiteiden suspendoimiseksi laskeutumattomaan tai hyvin hitaasti laskeutuvaan seosmuotoon, joka on syötettävissä ohuen kapillaarin läpi kohtuullisella paineella, tunnettu siitä, että se sisältää proteiinin tai peptidin vesipitoisena liuoksenä tai kiteisenä ja yhdistettynä liuokseen, jossa on sellaisenaan tai hydrolysoituna yksi tai useampi seuraavista polymeereistä: alginaatti, dekstriini, kitosaani tai pektiini.  
10
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että polymeerit tai niiden hydrolysaatit aiheuttavat proteiinien tai peptidien kiteytymisen.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että syntyvät tai  
15 aiemmin valmistetut proteiinikiteet saavat vapaasti leijua tasa-aineisena suspensiona.
4. Patenttivaatimusten 1 - 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteytettävä proteiini on entsyyymi, polypeptidi, hormoni, vasta-aine tai sen  
20 osa sellaisenaan tai modifioituna.
5. Patenttivaatimusten 1 – 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että syntyvät tai suspendoidut kiteet ovat pysyviä näissä polymeereissä.
6. Patenttivaatimusten 1 – 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteytävä  
25 polymeeri on alginaatti tai sen geeli.
7. Patenttivaatimusten 1 – 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteytävä polymeeri on dekstriini.  
30

8. Patenttivaatimusten 1 – 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteyttävä polymeeri on kitosaani tai sen geeli.
  9. Patenttivaatimusten 1 – 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteyttävä polymeeri on pektiini tai sen geeli.
  10. Patenttivaatimusten 1 – 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteyttävä aine on kahden tai useamman polymeerin seos.
  11. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että kiteyttävä polymeeri on hydrolysoitu.
- 15
- 20
- 25
- 30

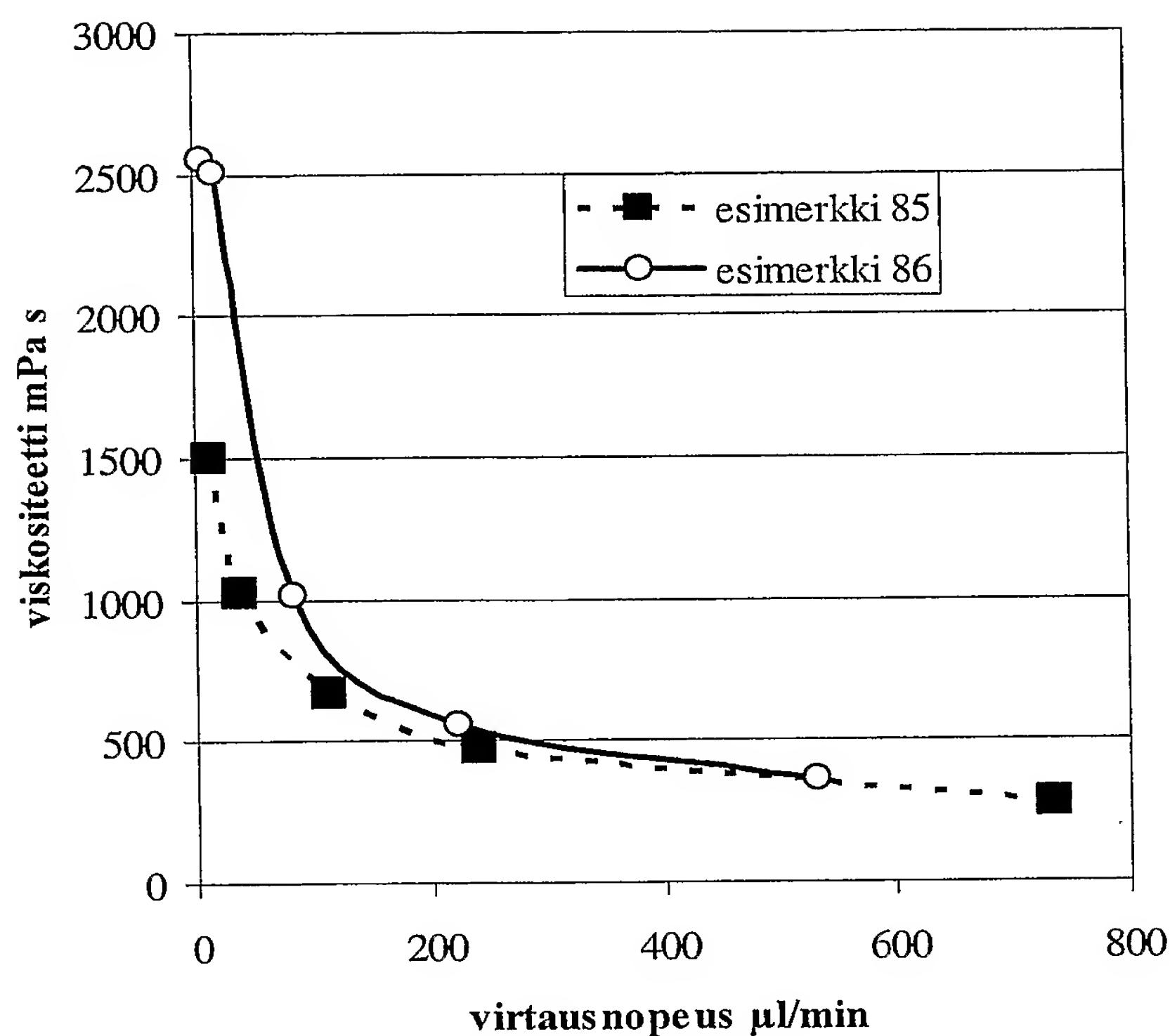
L 4



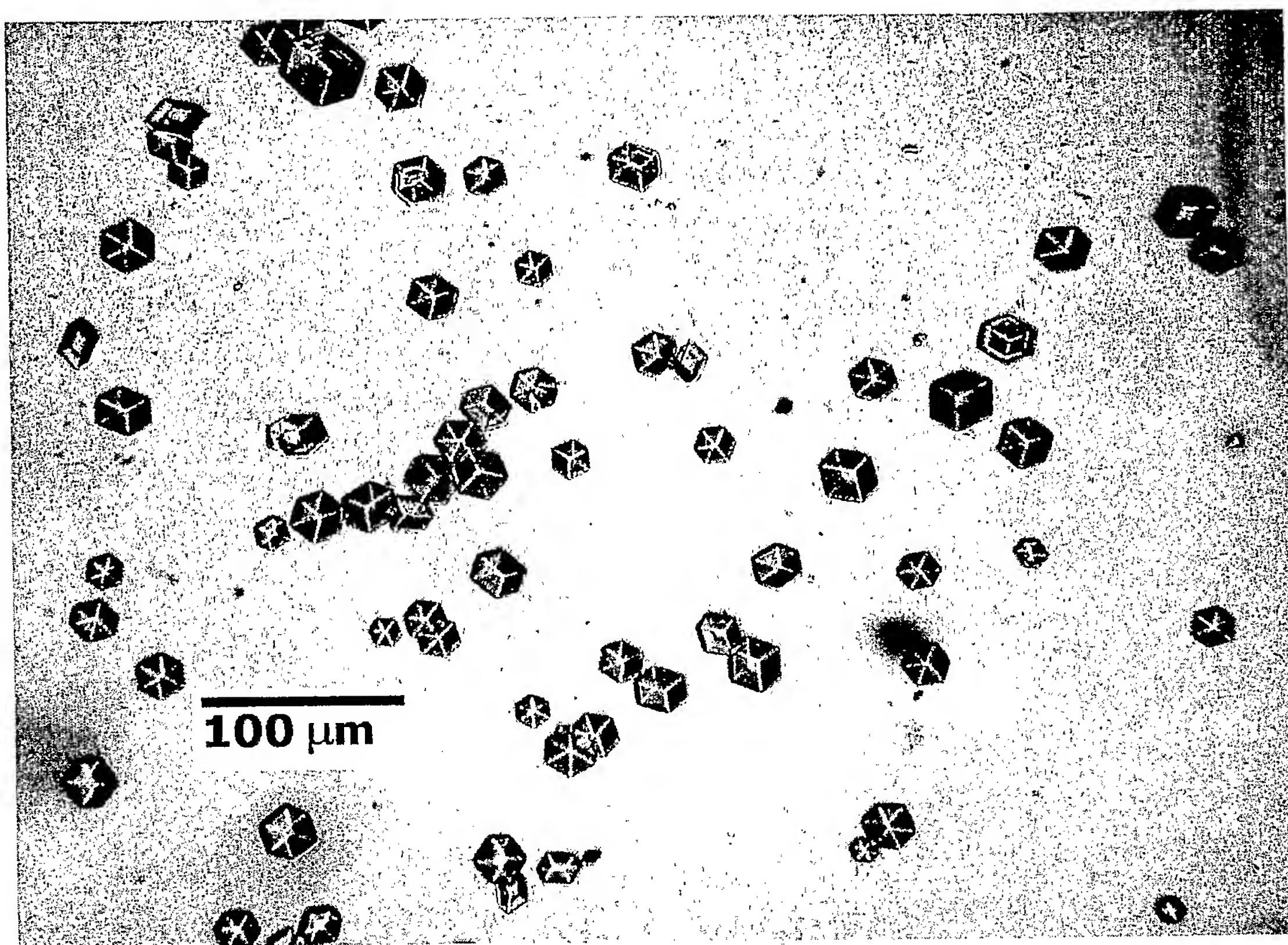
Kuvio 1.

Paineen vaikutus virtausnopeuteen 0,48 mm kapillaariputkessa

L 4

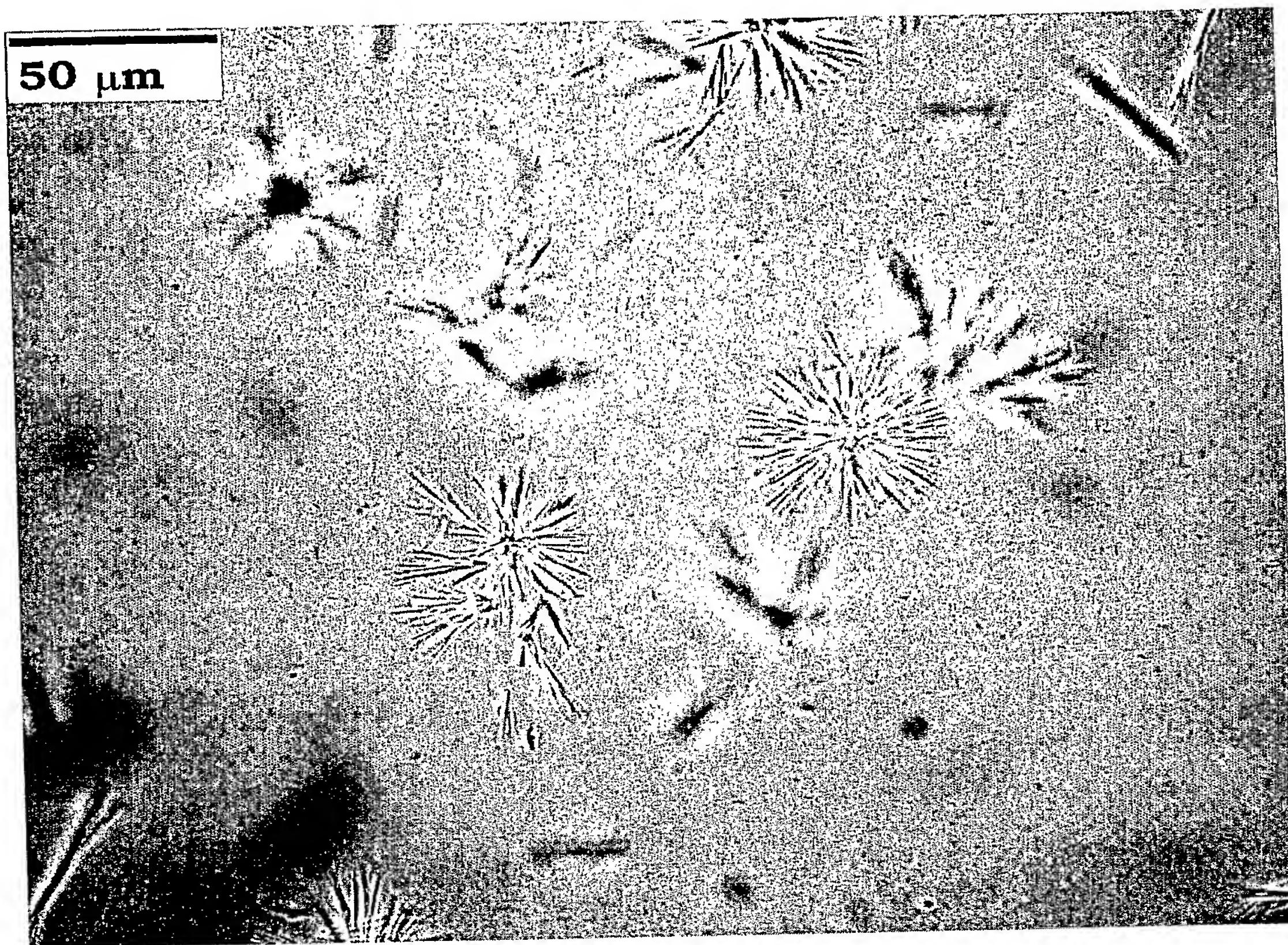


Kuvio 2.  
Virtausnopeuden vaikutus viskositeettiin 0,48 mm kapillaariputkessa.



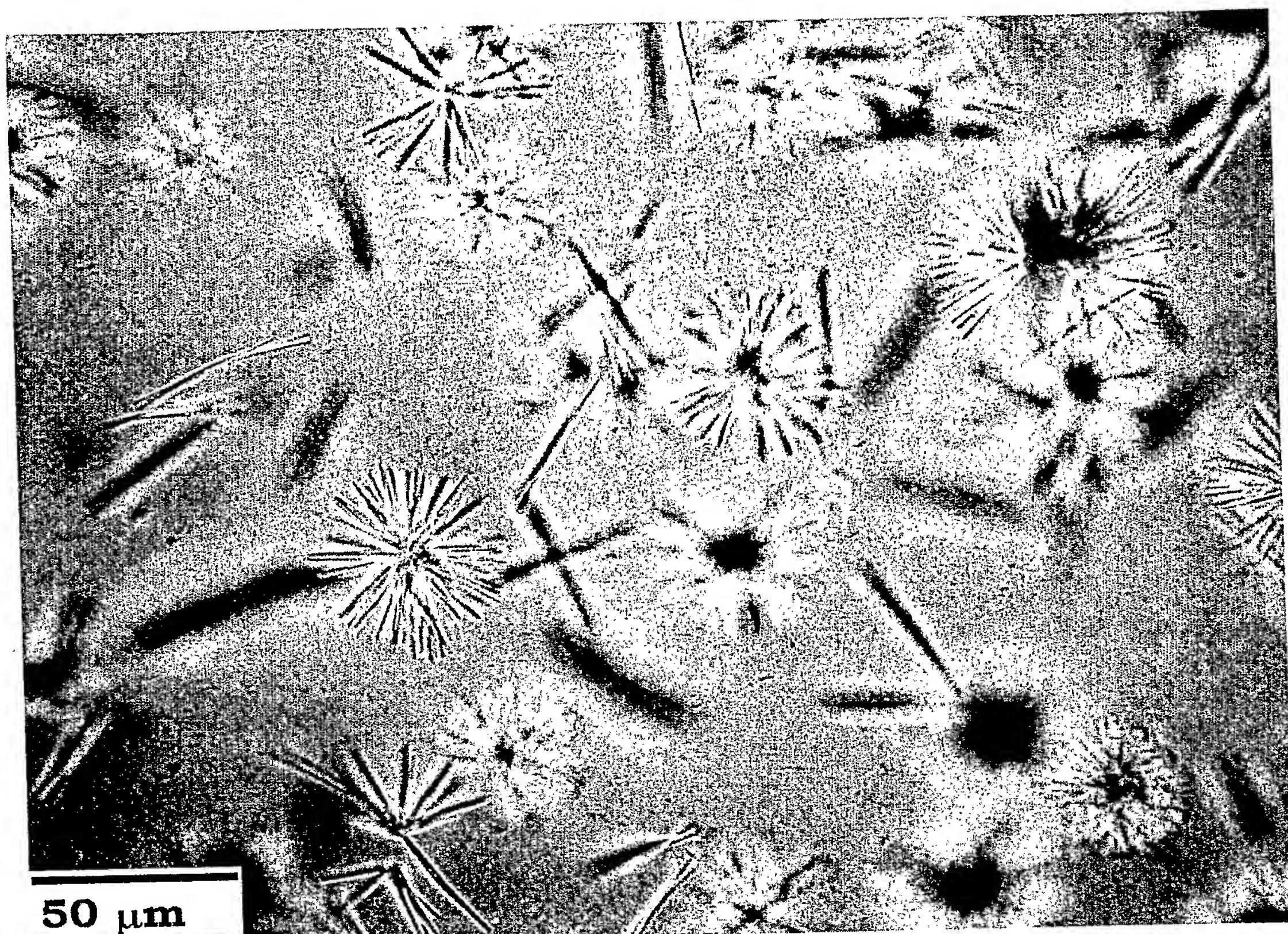
Valokuva 1.

Esimerkki 1. Ihmisen insuliinin kiteitä natriumalginaatissa



Valokuva 2

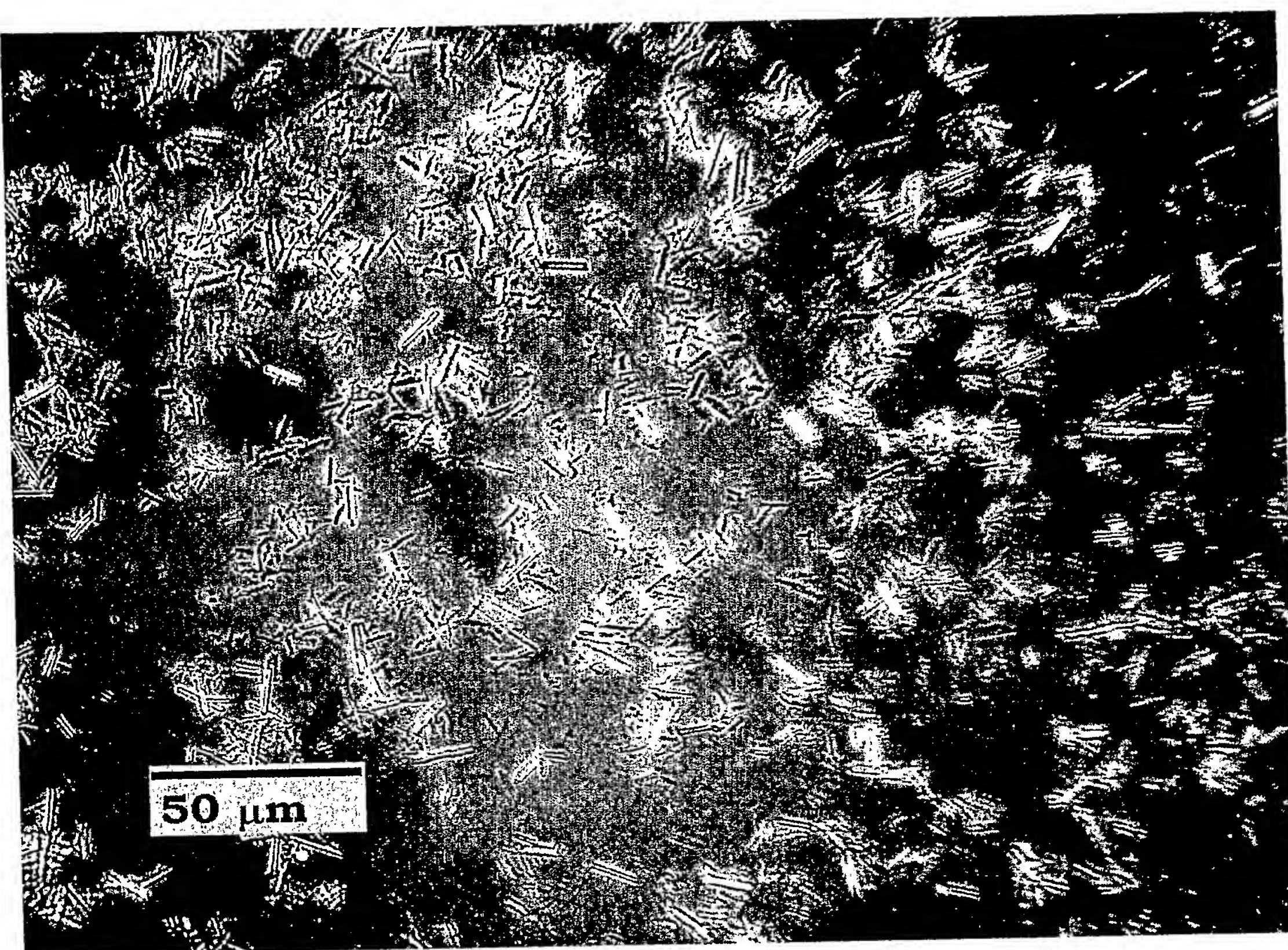
Esimerkki 2. Ihmisen insuliinin kiteitä 1,5 % kalsiumalginaattigelissä



Valokuva 3.

Esimerkki 3. Ihmisen insuliinin kiteitä 0,9 % kalsiumalginaattigeelissä

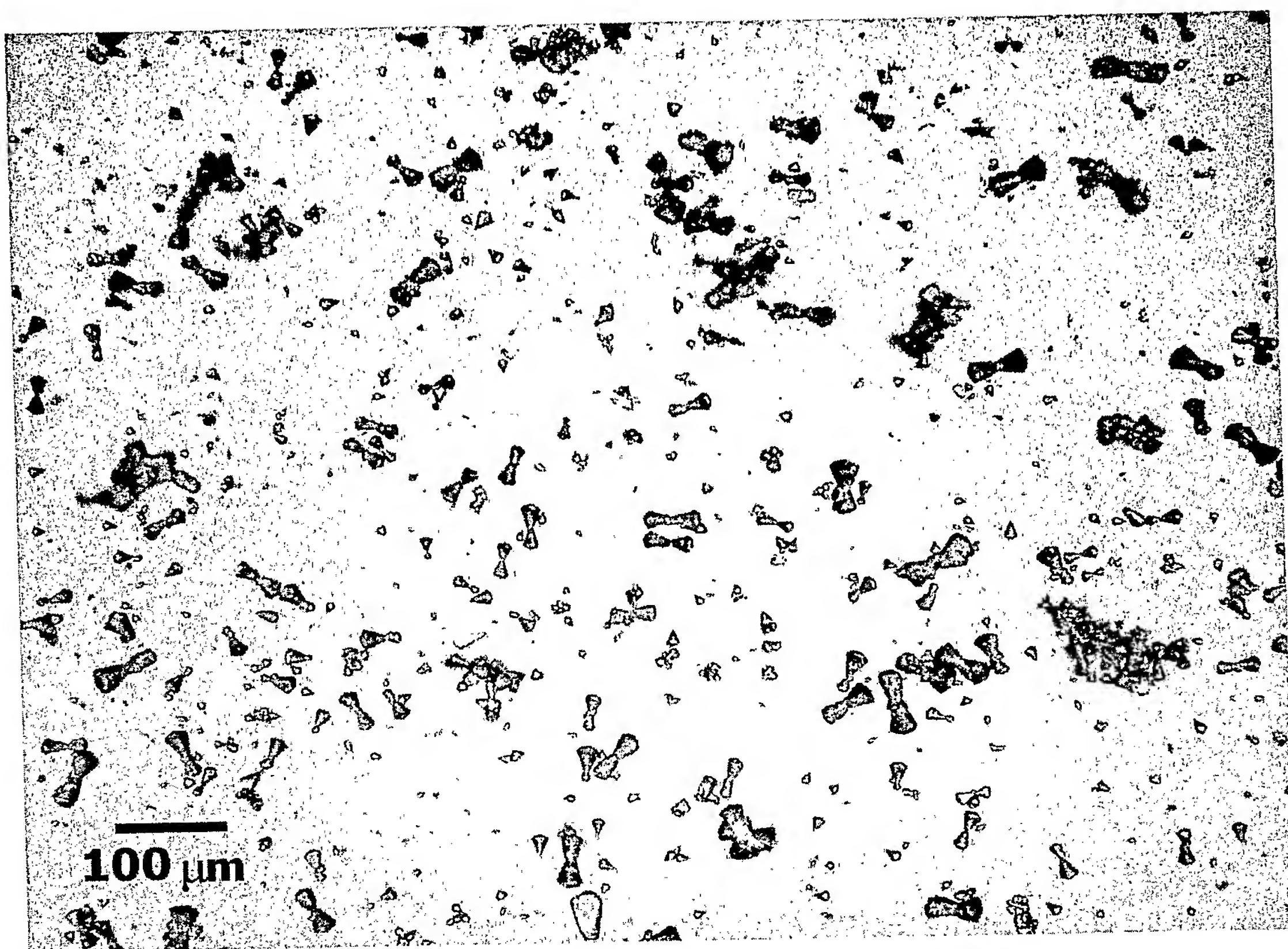
L4



Valokuva 4.

Esimerkki 4. Sian insuliinin kiteitä 0,45 % kitosaanissa

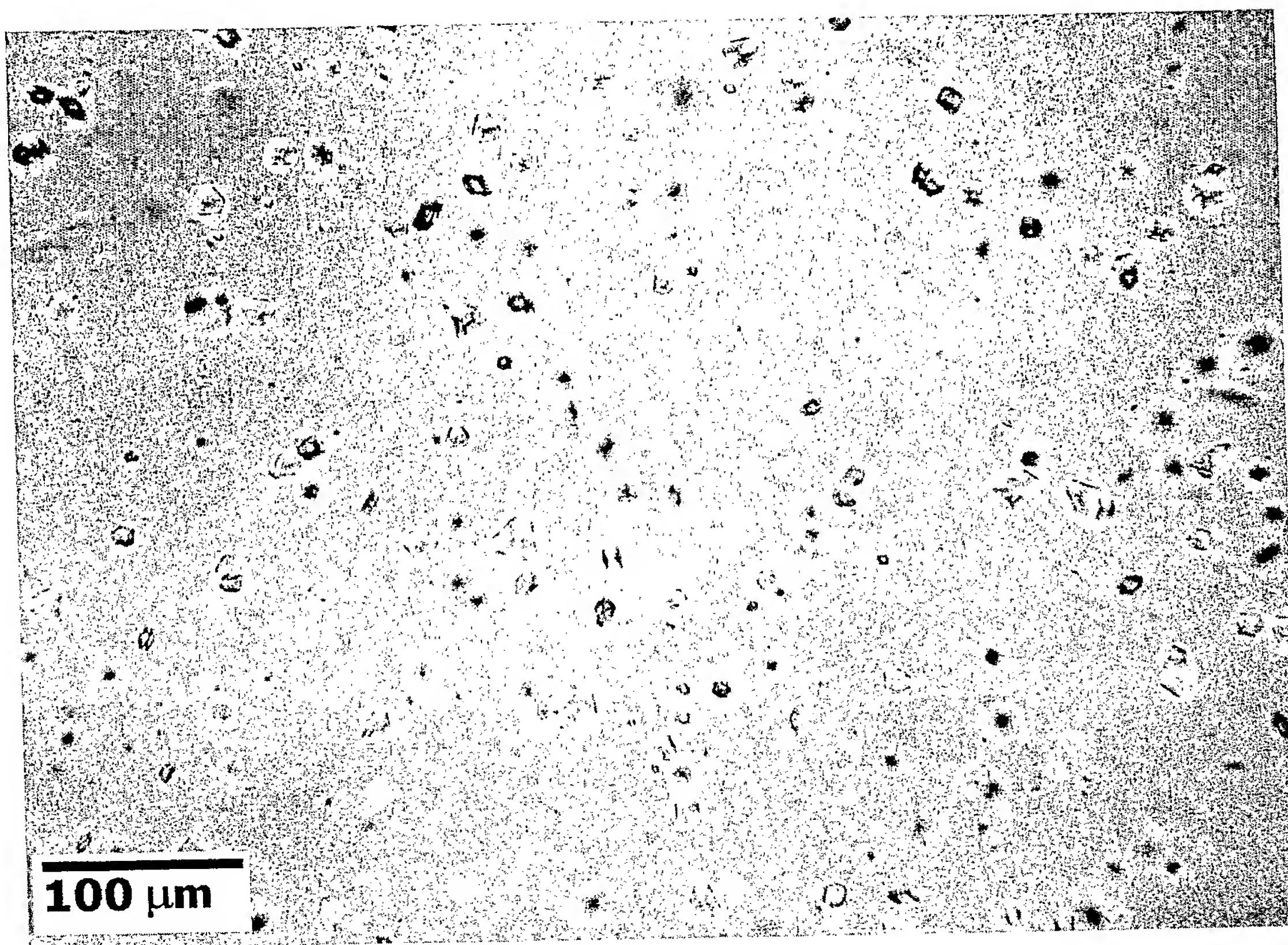
L 4



Valokuva 5.

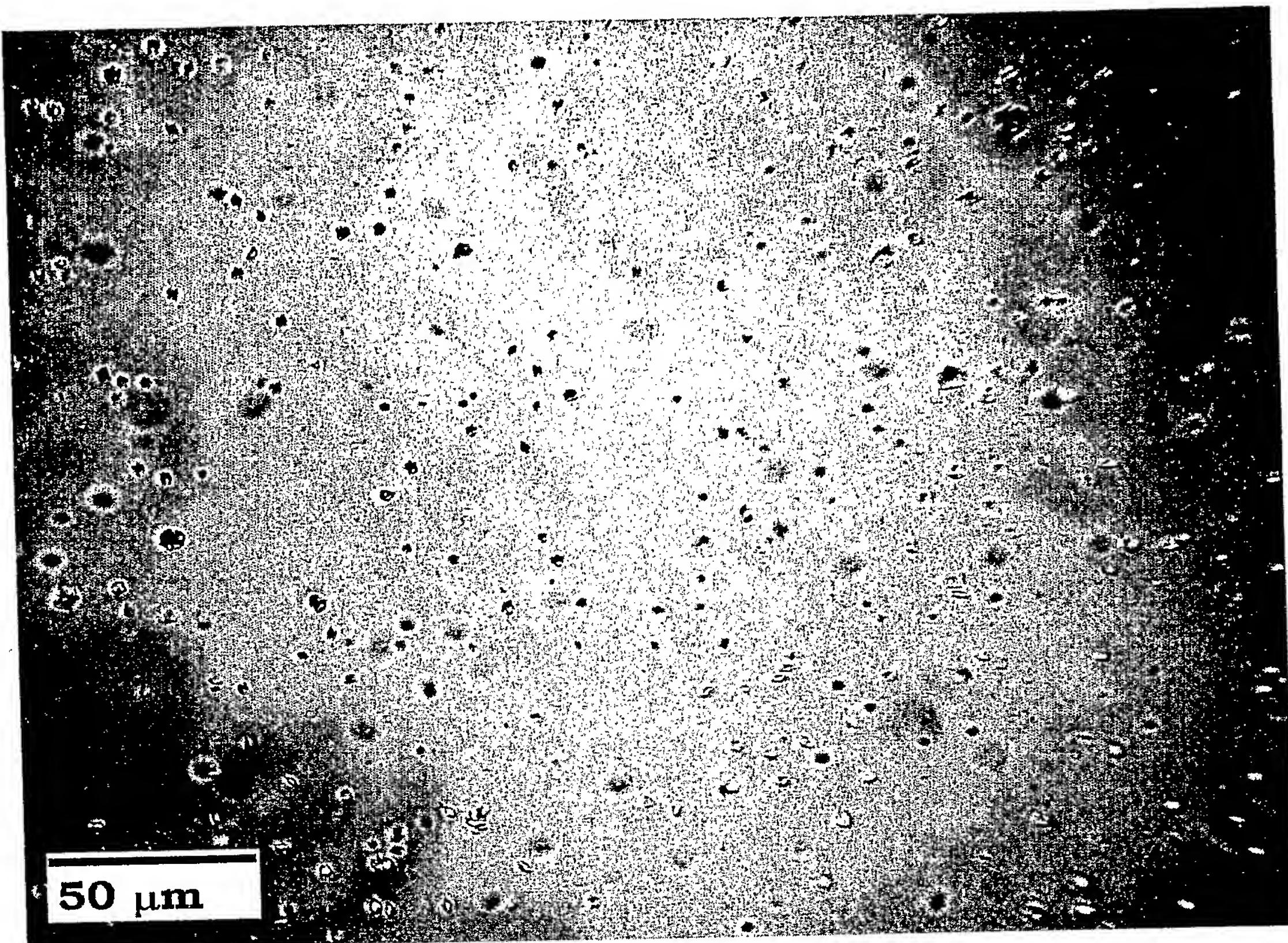
Esimerkki 6. Ihmisen insuliinin kiteitä 0,45 % kitosaanissa

L 4



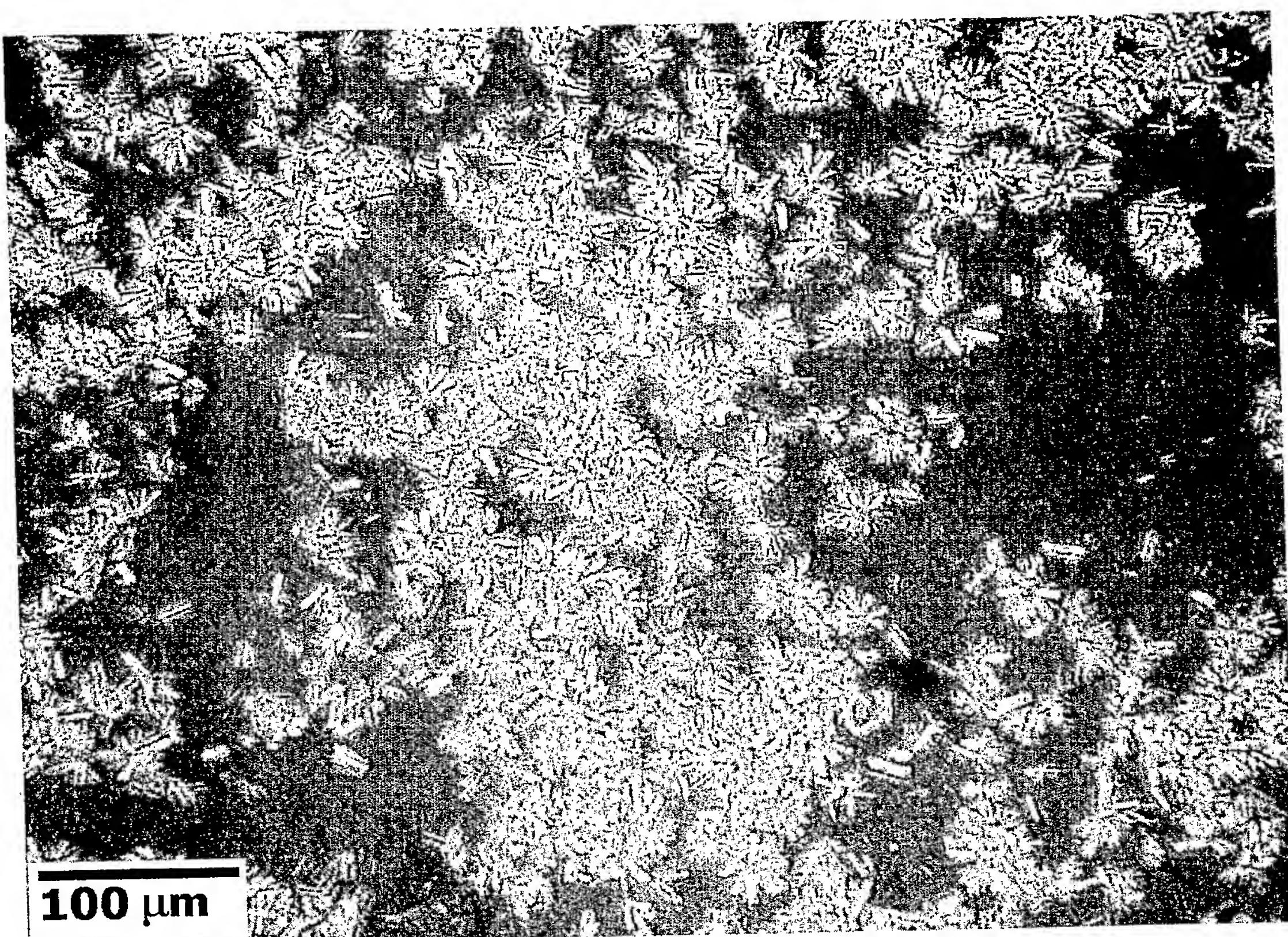
Valokuva 6.

Esimerkki 8. Sian insuliinin kiteitä kitosaanin ja natriumalginaatin seoksessa



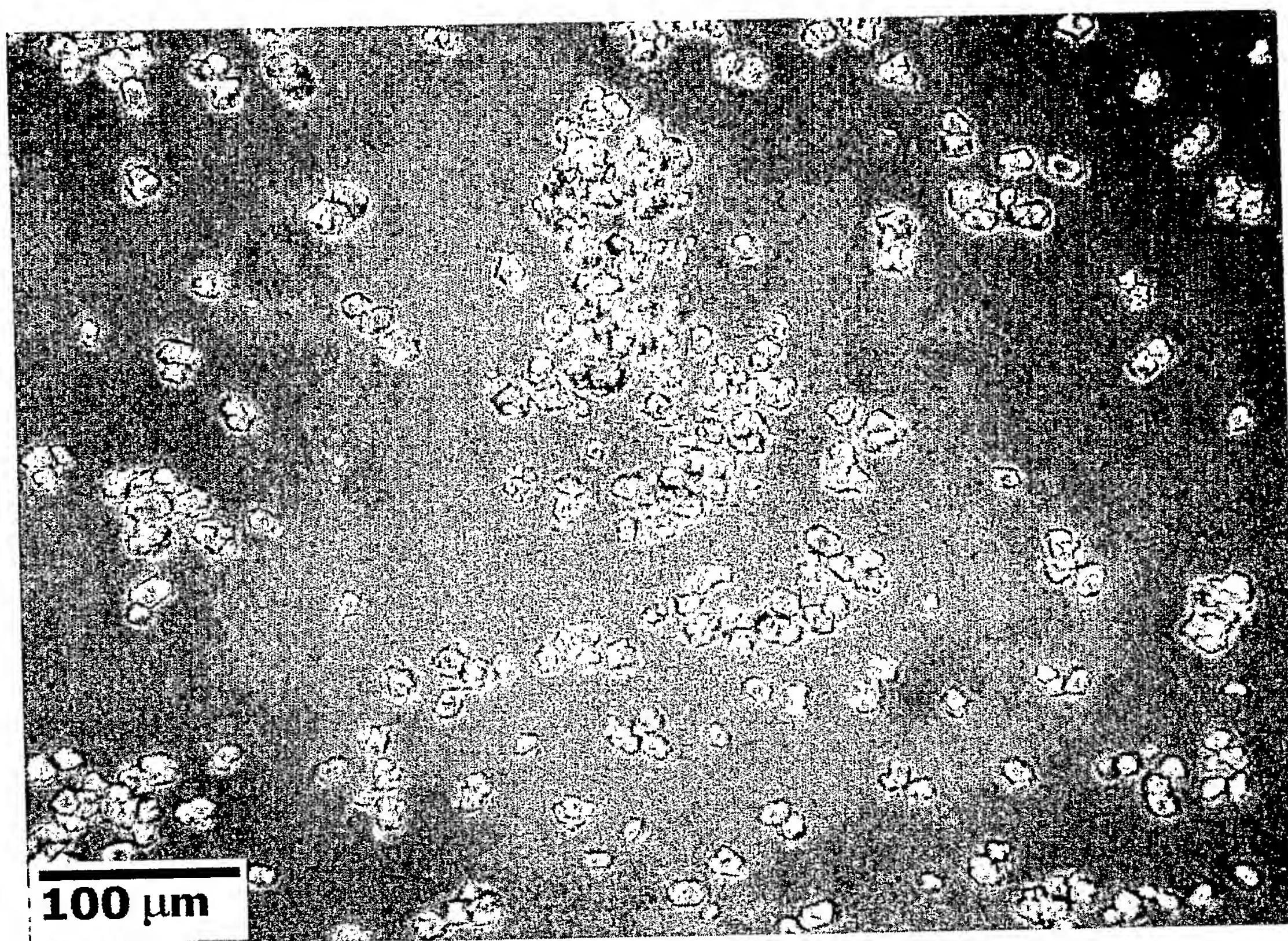
Valokuva 7.

Esimerkki 10. Sian insuliinin kiteitä glysiinin ja kitosaanin muodostamassa geelissä



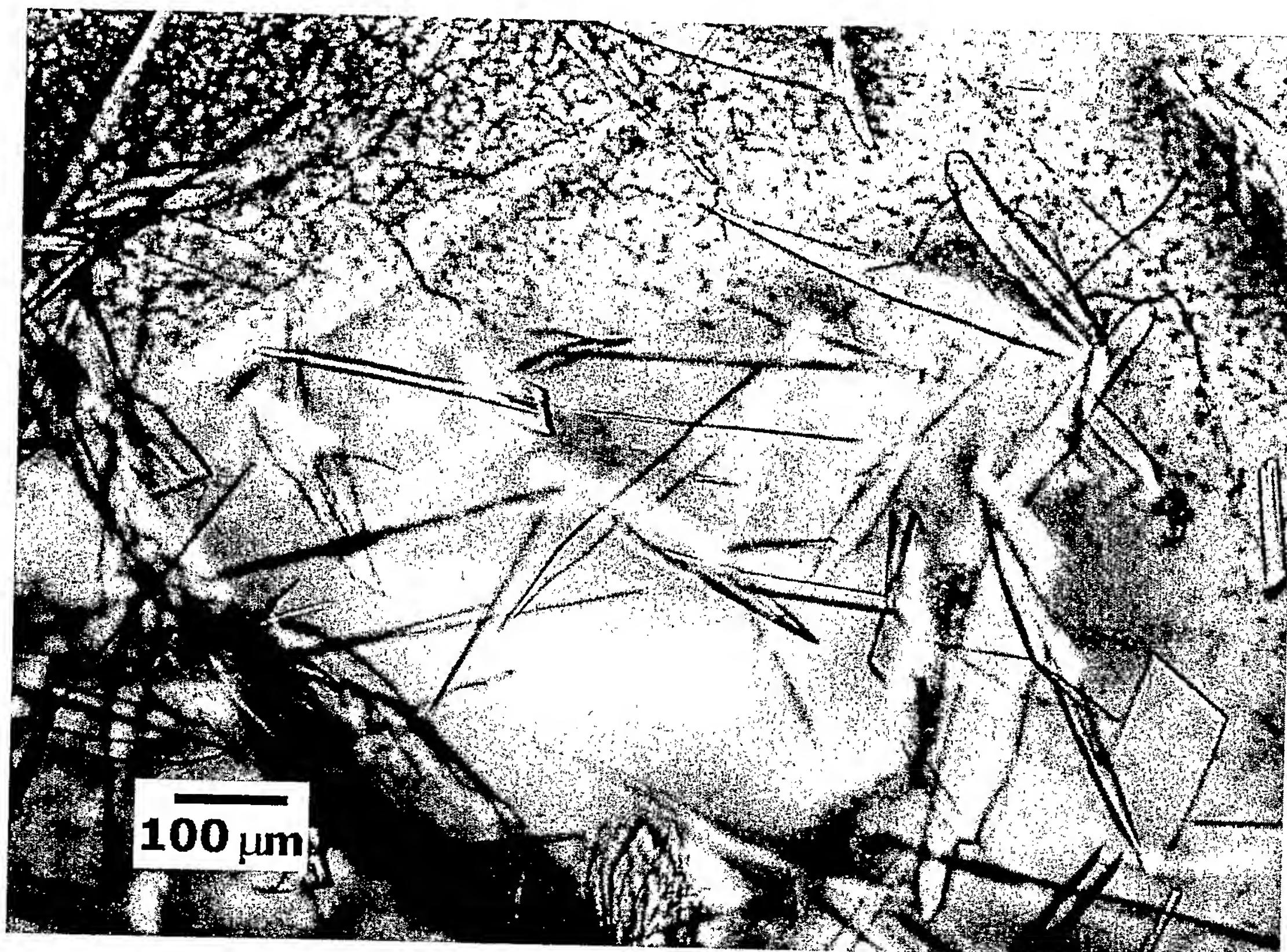
Valokuva 8.

Esimerkki 11. Sauvamaisia glukoosi-isomeraasin kiteitä pektiinigeelissä.



Valokuva 9.

ESimerkki 11. Glukoosi-isomeraasin kiteet ilman pektiiniä.



Valokuva 10.

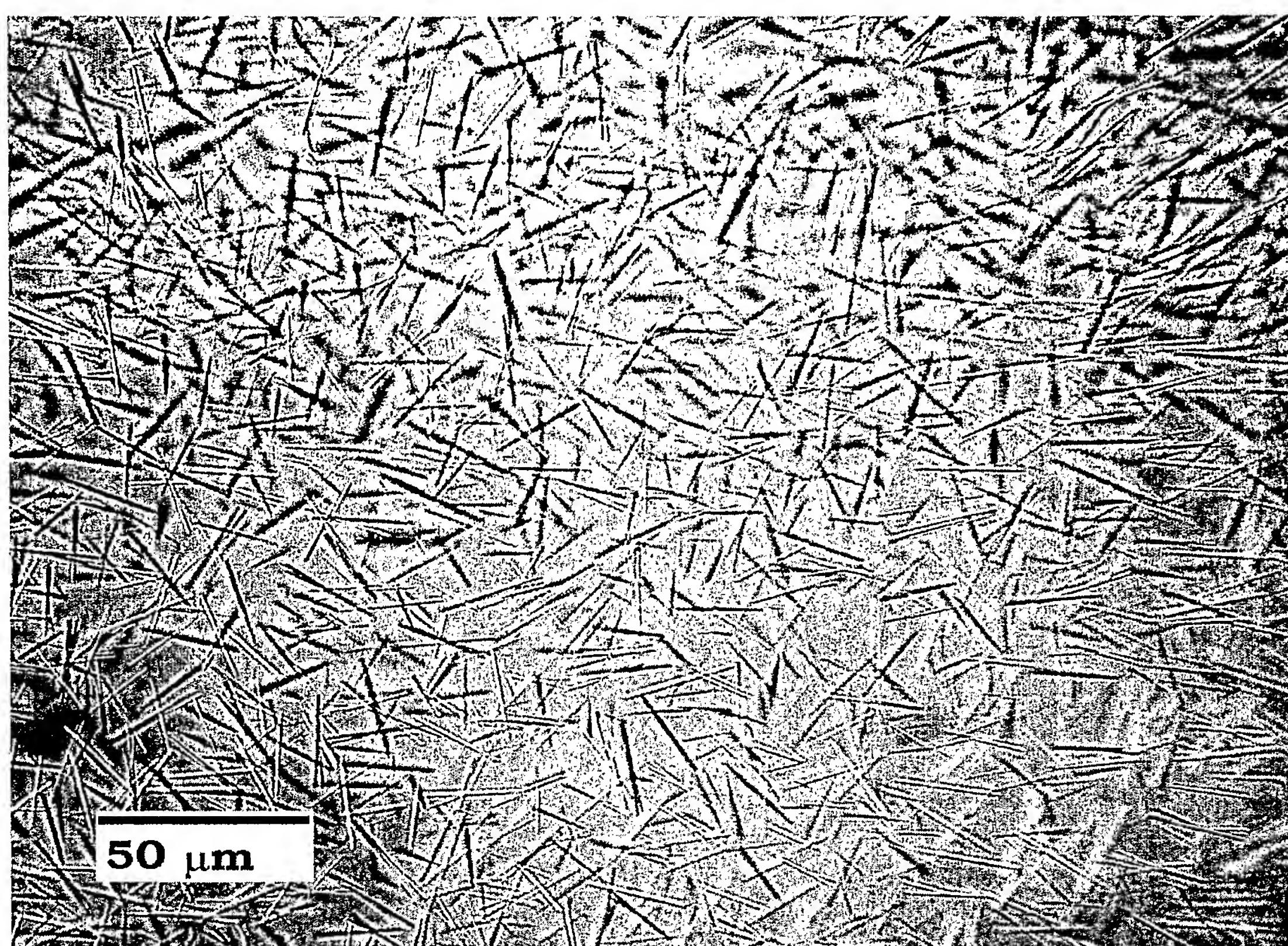
Esimerkki 44. Ksylanaasin kiteitä alginaatin hydrolysaatissa

L 4



Valokuva 11.

Esimerkki 56. Glukoosi-isomeraasin kiteitä pektiinin hydrolysaatissa



Valokuva 12.

Esimerkki 72. Insuliinin kiteitä pektiinin hydrolysaatissa